FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1969

THÈSE

N° 799

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

François, Jean-Jacques DHIVER

Né le 2 Novembre 1942 à ORLÉANS (Loiret)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris
Attaché-assistant de Microbiologie
à la Faculté de Médecine de Paris
(C.H.U. Pitié-Salpêtrière)

Présentée et soutenue publiquement le

SEROLOGIE DES OREILLONS PAR LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION. SON INTÉRÊT POUR LE DIAGNOSTIC ET POUR L'ÉPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS OURLIENNES

Président : Monsieur D. CHRISTOL (Professeur)

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI°
1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523711_0059

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

-:-

Année 1969 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

François, Jean-Jacques DHIVER

Né le 2 novembre 1942 à Orléans (Loiret)

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Attaché-assistant de Microbiologie à la Faculté de Médecine de Paris
(C.H.U. Pitié-Salpêtrière)

-:-

Présentée et soutenue publiquement
le

-:-

SEROLOGIE DES OREILLONS PAR LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION. SON INTERET POUR LE DIAGNOSTIC ET POUR L'EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS OURLIENNES

-:-

Président : Monsieur D. CHRISTOL (Professeur)

-:-

DACTYLO-SORBONNE
8, rue Casimir Delavigne
PARIS - 6ème
1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ALAJOUANINE (T), BENARD (H), BERNARD (E), BINET (L), BULLIARD (H), CATHALA (J), CHABROL (E), CHAILLEY-BERT (P), CHEYMOL (J), COSTE (F.), DEBRE (R), DECHAUME (M), GALLIARD (H), GAUDARD d'ALLAINES (F.de), GENNES (L.de), GIROUD (A), HAZARD (R), HEUYER (G), LACOMME (M), LAMY (M), LAROCHE (G), LELONG (M), LEVY (Mlle J), LEVY-SOLAL (E), LIAN (C), MADURO (R), MARCHAL (G), MATHIEU (P), MONOD (R), MOREAU (R), MOULONGUET (P), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D), PIEDELIEVRE (R), QUENU (J), RENARD (G), SENEQUE (J), STROHL (A), TANON (L), TURPIN (R), VERNE (J).

DOYEN	Georges BROUET
1er assesseur	Daniel BARGETON
2e assesseur	Jean GOSSET

A - CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

	MM.
Anatomie	DELMAS (A)
	HUARD (P)
à titre personnel	CABROL (Ch)
- -	OLIVIER (G)
Anatomie et Cytologie pathologiques	DELARUE (J)
à titre personnel	NEZELOF (Ch)
- -	ORCEL (L)
Biochimie médicale	JAYLE (M.F)
	DESGREZ (P)
	POLONOVSKI (J)
Chimie Pathologique	SCHAPIRA (G)
à titre personnel	CARTIER (P)
- -	DREYFUS (J.Cl)
Biologie médicale (à titre personnel)	BOURLIERE (F)
	HARTMANN (L)
Biophysique médicale	BUGNARD (L)
	DJOURNO (A)
	DOGNON (A)

MM.

Biophysique médicale	
à titre personnel	KELLERSHOHN (L)
- -	GOUGEROT (L)
- -	ROUCAYROL (J.Cl)
Cancérologie expérimentale	MATHE (G)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J)
Histologie et Embryologie	COUJARD (R)
	TUCHMANN-
	DUPLESSIS (H)
à titre personnel	RACADOT (J)
Microbiologie	FASQUELLE (R)
Bactériologie et Virologie	TOURNIER (P)
à titre personnel	BARBIER (P)
Parasitologie	LARIVIERE (M)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.P)
à titre personnel	LOEPER (J)
Pharmacologie	BOISSIER (J.R)
	LECHAT (P)
Physiologie	BARGETON (D)
	MALMEJAC (J)
	PARROT (J)
à titre personnel	DEJOURS (P)
Physiologie et biologie appliquée aux sports	SCHERRER (J)

B - CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

I°- Médecine

Biologie médicale	FAUVERT (R)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie	COURY (Ch.)
Hygiène et Médecine préventive	BOYER (J)
Médecine du Travail	DESOILLE (H)
Médecine légale, droit médical et déontologie	DEROBERT (L)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.C)
Pathologie médicale	BUGE (A)
	BRICAIRE (H)
	CORNET (A)
	HOUSSET (E)
	LAROCHE (Cl.)

MM.

Pathologie médicale	
à titre personnel	AZERAD (E)
- -	BOUR (H)
- -	BROCARD (H)
- -	CAROLI (J)
- -	FACQUET (J)
- -	LAMBLING (A)
- -	LAUNAY (Cl.)
- -	PAYET (M)
- -	PERRAULT (M)
- -	SIGUIER (F)
- -	WORMS (R)
- -	BOUVIER (J)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J)
Pathologie et Thérapeutique générales	MAURICE (P)
Thérapeutique	LAMOTTE (M)
Thérapeutique appliquée	MARCHE (J)

Chaires de Cliniques :

Clinique cardiologique (Boucicaut)	LENEGRE (J)
- - (Broussais)	SOULIE (P)
Clinique dermatologique (St-Louis)	DUPERRAT (F)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P)
à titre personnel	BASTIN (R)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J)
à titre personnel (neuro-psychiatrie)	PICHOT (P)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R)
à titre personnel	LHERMITTE (F)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L)

MM.

Clinique des maladies du sang (Broussais)	BERNARD (J)
à titre personnel (hématologie)	ANDRE (R)
- - -	BOUSSER (J)
- - -	DREYFUS (B)
Cliniques médicales — Bicêtre	DEPARIS (M)
Cliniques médicales — Broussais	MILLIEZ (P)
Cliniques médicales — Cochin	PEQUIGNOT (H)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIETY (M)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	BOUDIN (G)
Cliniques médicales — -	CONTE (M)
Cliniques médicales — -	KOURILSKY (R)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANCON (L)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A)
Clinique et Séméiologie médicales (Antoine-Chantin)	DOMART (A)
Séméiologie médicale (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y)
- - (Pitié)	RAMBERT (P)
- - (Rothschild)	WOLFROMM (R)
Clinique d'Hydrologie et de Climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch)
à titre personnel	GIBERTON (A)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu)	DEROT (M)
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J)
à titre personnel	RICHET (G)
- -	CROSNIER (J)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	ROYER (P)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	MOZZICONACCI(P
Clinique médicale infantile et de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J)
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	BRISSAUD (H)
à titre personnel	LESOBRE (R)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S)

MM.

Hygiène et Clinique de la première enfance (Trousseau) ..... LAPLANE (R)
à titre personnel ..... POLONOVSKI(Cl.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec) ..... BROUET (G)
à titre personnel ..... KREIS (B)
- - ..... MEYER (A)

Clinique de rééducation motrice ..... GROSSIORD (A)

Electroradiologie ..... LEDOUX-LEBARD (M) ..... LEFEBVRE (J)

Radiologie médicale ..... DESGREZ (H)
à titre personnel ..... FISCHGOLD (H)
- - ..... TUBIANA (M)
- - ..... CHERIGIE (E)

Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin) ..... DELBARRE (F)
Clinique rhumatologique (Lariboisière) ..... SEZE (S.de)
Clin. toxicologique (Fernand-Widal) GAULTIER (M)

2°- Chirurgie

Anesthésiologie ..... VOURC'H (G)

Pathologie chirurgicale ..... LAURENCE (G) ..... KUSS (R) ..... N...

à titre personnel ..... RAMADIER (J)

Physiologie et pathologie obstétricales ..... MORIN (P)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale ..... MONSAINGEON(A)

Chaires de Cliniques :

Clinique carcinologique (Gustave-Roussy) ..... DENOIX (P)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker) ..... REDON (H)
à titre personnel ..... BREHANT (J)

MM.

Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.L)
	-	BAUMANN (J)
	Cochin	LEGER (L)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J)
	St-Antoine	GOSSET (J)
	Salpêtrière	SICARD (A)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)		ROUX (M)
Séméiologie et clinique chirurgicales(Broussais)		POILLEUX (F.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Saint-Louis)		DEBEYRE (J)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatclogique(Cochin)		MERLE d'AUBIGNE(R)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Foch)		PADOVANI (P)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Beaujon)		CAUCHOIX (J)
Clinique traumatologique et orthopédique (Raymond-Poincaré)		JUDET (R)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique(Enfants-Malades)		FEVRE (M)
à titre personnel		CHIGOT (P.L)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)		MATHEY(J)
à titre personnel		GAUDART D'ALLAINES (Cl. de)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)		HUGUIER (J)
Clinique obstétricale (Baudelocque)		LEPAGE (F)
Clinique obstétricale (Saint-Antoine)		MERGER (R)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)		VARANGOT (J)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)		DAVID (M)
à titre personnel		LEBEAU (J.)

	MM.
Clinique ophtalmologique (Cochin)	BREGEAT (P)
- - (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	CERNEA (P)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P)
- - (Necker)	COUVELAIRE (R)

C - PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie	GILLOT (Cl.)
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D)
Bactériologie	LE MINOR (L)
Biochimie médicale	CARTIER (P) GONNARD (P) NORDMANN (J)
Chirurgie	CERBONNET (G)
Hématologie	BESSIS (M) BILSKI-PASQUIER (G)
Hygiène	BLANCHER (G) CORRE-HURST (Me L)
Médecine légale	CECCAL (P) HADENGUE (A) FOURNIER (E)
Médecine générale	AUSSANNAIRE (M)
Maladies infectieuses	DUPONT (V)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G)
Pédiatrie	ROSSIER (A)
Physique médicale	COURSAGET (J) GREMY (F) PELLERIN (P)
Physiologie	DURAND (J) GIRARD (Fr.) HUGELIN (A)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A)
Pharmacologie	SCHMITT (H)

D - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Pathologie chirurgicale	RUDLER (J) Pr.s.ch.

E - PROFESSEURS ASSOCIES

	MM.
Hormonologie	MORICARD (R)
Statistique médicale et épidémiologie	SCHWARTZ (D)
Néphrologie	MAXWELL (M)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J)
Conseiller administratif	M. SALLIER (G)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M.le Docteur HAHN (A)
Conservateurs	Mme FORGET (F) Mlles DUMAITRE (P), LAURENT(H),LE NOIR(G)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J) Mlles DUROZOY(M.F) ROBERGE (D), LE QUANG LINH (G), REUGE (M)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A mes parents

A ma soeur

A mon beau-frère
le Docteur Henri BOREL
Neuropsychiatre

A mon frère
le Docteur André DHIVER
Médecin-biologiste

A ma belle-soeur

A ma famille

A mes amis

A Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Professeur de Microbiologie à la Faculté
de Médecine de Paris

Biologiste de l'Hôtel-Dieu

Qui a eu la bienveillance de
m'accueillir dans son
Département à la Faculté

En hommage très respectueux
et reconnaissant

A Monsieur le Professeur D. CHRISTOL

Professeur de Microbiologie à la Faculte de Médecine de Paris

Biologiste de l'Hôpital Claude Bernard

Qui a eu la bienveillance de m'accueillir dans son laboratoire

Qui a bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude et le témoignage de mon profond respect

A Monsieur le Professeur P. BARBIER

Professeur de Microbiologie à la Faculté
de Médecine de Paris

A qui je dois l'honneur de
participer à l'enseignement
de la Chaire de Bactériolo-
gie et de Virologie du
C.H.U. Pitié-Salpêtrière

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de ma très res-
pectueuse reconnaissance

A Madame le Docteur PEROL

Déléguée dans les fonctions de Professeur Agrégé de Microbiologie à la Faculté de Médecine de Paris

Responsable de la section Virologie du Laboratoire Central de l'Hôpital Claude Bernard

Dont l'enseignement éclairé et les conseils précieux sont à la base de ce travail

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma respectueuse admiration

A mes Maîtres du Département de Microbiologie
de la Faculté de Médecine de Paris

Monsieur le Professeur P. TOURNIER

Monsieur le Professeur L. LE MINOR

Madame le Professeur Agrégé E. BERGOGNE

Monsieur le Professeur Agrégé F. BRICOUT

Monsieur le Professeur Agrégé Ch. CHANY

Monsieur le Professeur Agrégé G. DAGUET

Monsieur le Professeur Agrégé J. DUVAL

Monsieur le Professeur Agrégé Ph. GOULLET

Monsieur le Professeur Agrégé H. MOLLARET

Monsieur le Professeur Agrégé P. NEVOT

En hommage à l'enseignement
éminent qu'ils m'ont pro-
digué

A mes Maîtres d'Externat

Monsieur le Docteur P. ABOULKER

Monsieur le Professeur Agrégé J. RISTELHUEBER

Monsieur le Professeur P. ABOULKER

Monsieur le Docteur R. EVEN

Monsieur le Docteur J.P. GUILLAUMIN

Monsieur le Professeur Agrégé E. HOUSSET

En remerciement de ce
qu'ils m'ont appris

A Madame L. JAILLARD

Technicienne au Laboratoire de Virologie
de l'Hôpital Claude Bernard

Pour l'aide très précieuse
qu'elle nous a apportée
au cours de ce travail

Mes plus sincères remercie-
ments

SEROLOGIE DES OREILLONS PAR LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION.

SON INTERET POUR LE DIAGNOSTIC ET POUR L'EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS OURLIENNES

-:-

INTRODUCTION

-:-

La connaissance du virus ourlien a favorisé la mise au point de différentes techniques de laboratoire permettant le diagnostic biologique de la maladie dont ce virus est responsable. Si l'importance de ces techniques reste limitée devant des cas évidents de parotidite ourlienne avec notion de contage, elles sont par contre d'une grande utilité dans les formes frustes, unilatérales ou inapparentes, en cas d'atteinte des autres glandes salivaires et surtout lorsque le virus frappe d'autres organes, notamment en cas de méningite lymphocytaire, de pancréatite, d'orchite et des localisations les plus rares du virus ourlien (arthrites, néphrites, thyroïdites, surrénalites).

Après un rappel historique et clinique de la maladie, nous ferons le point des connaissances actuelles sur le virus et ses diverses propriétés. C'est dans le but de résoudre les diagnostics difficiles que nous avons pratiqué avec Madame le Docteur PEROL, dans le service du Professeur CHRISTOL, au laboratoire de virologie de l'Hôpital Claude Bernard l'isolement sur culture cellulaire d'une souche de virus ourlien productrice d'hémagglutinine.

Cette hémagglutinine, dont nous étudierons les conditions de préparation et les principa-

les propriétés, nous a permis de réaliser le dosage des anticorps ourliens dans le sérum des malades par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Notre étude porte sur des paires de sérums provenant de malades hospitalisés dans les services du Professeur MOLLARET et du Professeur BASTIN, chefs de service à l'Hôpital Claude Bernard. Nous avons pu apprécier la valeur de cette méthode comparativement aux autres techniques sérologiques classiques (neutralisation et fixation du complément) et elle nous a permis de faire le diagnostic de plusieurs cas d'infection ourlienne particulièrement intéressants.

-:-

CHAPITRE I

-:-

HISTORIQUE

-:-

I - Les découvertes cliniques

L'observation des oreillons est fort ancienne. "Dans l'île de Thasos, il survint des tumeurs bilatérales au niveau des oreilles dans une grande partie de la population ; ces tumeurs disparurent sans laisser de trace. Elles se formèrent chez les adolescents, chez les gens à la fleur de l'âge et parmi ces derniers chez tous ceux qui fréquentaient la palestre et les gymnases. Chez les uns immédiatement, chez les autres après quelque temps, il survenait des plegmasies douloureuses aux testicules".

Ainsi décrits par Hippocrate, les oreillons ne furent redécouverts que 22 siècles plus tard après une longue période de confusion avec les adénopathies cervicales suppurées ou non.

En 1790, HAMILTON montre la fréquente association d'orchites aux manifestations parotidiennes et décrit l'existence de signes d'atteinte du système nerveux central chez certains malades souffrant de parotidite.

En France, les travaux de la seconde moitié du 19e siècle représentent les oreillons comme

une maladie essentiellement glandulaire jusqu'à la thèse de GAILLARD en 1877 consacrée aux localisations nerveuses des oreillons. Ce n'est en fait qu'au début du XXe siècle que l'attention est attirée sur les divers aspects de la névraxite ourlienne. Il apparut ensuite que d'autres parenchymes glandulaires pouvaient être intéressés et que la maladie ourlienne était en réalité une maladie générale, infectieuse, contagieuse, épidémique, d'étiologie virale.

II - L'agent infectieux

L'étiologie virale des oreillons est connue depuis le début du siècle grâce à la reproduction expérimentale de la maladie chez le Singe.

Déjà en 1913, NICOLLE obtient des parotidites résolutives chez le macaque après inoculation du produit de ponctions de parotidites ourliennes. Mais c'est en 1934 que JOHNSON et GOODPASTURE en introduisant dans le canal de Stenon du Macacus Rhésus une petite quantité de salive prélevée chez un enfant atteint de parotidite ourlienne, réalisent la transmission expérimentale de la maladie et obtiennent le passage en série du virus ourlien. Ils montrent aussi que la parotidite est due à un agent filtrable.

En 1940, LEPINE, SOHIER et SAUTTER reproduisent une méningite lymphocytaire transmissible par injection sous arachnoïdienne au cynomolgus de liquide céphalo rachidien de méningite ourlienne.

En 1942, ENDERS et COHEN préparent un antigène fixant le complément à partir de parotides infectées et broyées.

Les premières tentatives de culture du virus ourlien en oeuf embryonné furent réalisées par ROCCHI en 1943 sur la membrane chorio allantoïdienne.

HABEL isole le virus ourlien en 1945 après inoculation dans le sac vitellin ou dans la cavité amniotique et démontre la présence du virus après une incubation de 7 à 12 jours et en l'absence de tout signe infectieux, la présence du virus par fixation du complément en utilisant comme antigène les liquides de l'oeuf contaminé.

LEVENS et ENDERS montrent que la multiplication du virus ourlien comme d'ailleurs celle du virus de l'influenza s'accompagne de la production d'une hémagglutinine. Les liquides extra embryonnaires de l'oeuf infecté agglutinent les globules rouges de poulet ou d'homme, ce qui permet de titrer les stocks de virus ourlien.

Ces souches virales atténuées sur embryon de poulet furent ensuite adaptées aux cultures cellulaires d'embryon de poulet in vitro par WELLER et ENDERS en 1948, puis à un grand nombre de cellules humaines ou simiennes par HENLE et DEINHARDT en 1955. Ces auteurs montrent que la multiplication du virus en cellules humaines cancéreuses Hela et en cellules épithéliales de rein de Singe s'accompagne de la production d'un effet cytopathogène transmissible en série dans certaines conditions, ouvrant ainsi la voie à de nombreux travaux.

-:-

CHAPITRE II

-:-

RAPPEL CLINIQUE

-:-

Il n'est pas dans notre propos de décrire ici la localisation parotidienne bilatérale habituelle de la maladie, survenant après une incubation longue et silencieuse de 18 à 21 jours ; elle est bien connue de tous ainsi que les autres localisations salivaires sous maxillaires et sublinguales.

Mais le tableau clinique des oreillons salivaires peut offrir quelques variantes pouvant rendre ce diagnostic délicat.

Les formes frustes sont très fréquentes chez l'enfant ; caractérisées par une tuméfaction parotidienne discrète, une légère élévation thermique fugace, une durée brève, elles sont souvent méconnues. Mieux, l'infection est souvent totalement inapparente ainsi que le prouve la présence d'anticorps chez un nombre élevé d'adultes sans antécédent connu.

La forme pharyngée fluxionnaire est exceptionnelle ; elle semble liée au développement anormal du lobe pharyngé de la parotide.

Les localisations glandulaires extra salivaires sont également bien connues. Parmi ces localisations seule l'orchite est fréquente. De diagnostic facile quand elle succède à la

parotidite, elle peut la précéder ou rester isolée et pose alors le diagnostic des autres orchiépididymites aiguës.

Les autres localisations glandulaires : prostatite, mastite, ovarite sont exceptionnelles et leur étiologie virale devrait en fait être contrôlée par les moyens de diagnostic biologique dont nous disposons actuellement. Il en serait de même pour les exceptionnelles localisations thyroïdiennes ou surrénaliennes, pour les atteintes des glandes lacrymales et pour les hépatites.

La pancréatite ourlienne s'observe principalement chez l'adulte dans 1 à 6 p.cent des cas suivant les auteurs. Elle apparaît habituellement entre le 4e et le 6e jour après la parotidite ; plus rarement elle débute en même temps qu'elle ou la précède de quelques jours. Très rarement elle fut observée pendant la convalescence. Après un tableau parfois dramatique de crise solaire avec douleur épigastrique, tendance au collapsus, vomissements et diarrhée, l'évolution se fait en règle vers la guérison en 2 à 10 jours. En réalité, les formes frustes seraient très fréquentes et l'existence d'un diabète post-ourlien est actuellement bien établie. HARRIS en 1899 en rapporte le premier cas et la thèse de COURONNE 1926 réunit les principales observations.

Si l'on considère que l'atteinte pancréatique peut être une manifestation isolée des oreillons, il serait désormais indispensable de rechercher cette étiologie virale par une étude sérologique systématique de toutes les pancréatites aiguës. SHARPS rapporte une pancréatite en l'absence de parotidite chez un garçon de 11 ans dont la soeur avait présenté des oreillons parotidiens.

Les localisations nerveuses des oreillons sont fréquentes ; c'est non seulement la réaction méningée biologique accompagnant ou précédant la parotidite, mais encore la méningite clinique véritable débutant entre le 5e et le 10e jour après l'apparition des signes parotidiens alors que l'état du malade est en voie d'amélioration. Assez fréquemment chez l'adulte sa survenue coïncide avec une localisation orchitique ; d'intensité variable, son évolution sera brève et la guérison totale en quelques jours.

La méningite ourlienne est parfois primitive et c'est l'apparition secondaire de l'atteinte parotidienne ou sous maxillaire, ou d'une orchite qui permet d'étiqueter le syndrome méningé. En l'absence de fluxion apparente, elle n'est reconnue que par la mise en évidence des points douloureux classiques et la recherche de la tuméfaction et de la rougeur de l'orifice des canaux de Stenon.

La méningite peut être isolée, non précédée ou non suivie d'une autre localisation ourlienne.

Le L.C.R. est tendu, eau de roche, les éléments nombreux (en général supérieurs à 300); si tout au début la cytologie peut être panachée, il s'agit en règle d'une lymphocytose pure. Le taux d'albumine est augmenté, le taux des chlorures normal ou légèrement abaissé, la glycorachie est normale, parfois légèrement augmentée ou diminuée. On peut alors suspecter la nature ourlienne de cette méningite lymphocytaire par la notion de contagion mais seuls les tests sérologiques spécifiques pourront l'affirmer.

La méningite ourlienne représenterait 10 à

15 p.cent des méningites à liquide clair non bactériennes.

Cette atteinte méningée peut s'accompagner d'une névraxite ourlienne dont le tableau varie selon l'étage du névraxe principalement intéressé et selon l'extension des lésions.

Malgré un tableau de méningo encéphalite sévère, l'évolution est le plus souvent favorable, la guérison obtenue en quelques jours. Il faut pourtant savoir réserver le pronostic de cette localisation, qui représente la principale cause de décès, heureusement exceptionnelle au cours des oreillons. Tous les nerfs craniens peuvent être intéressés ; l'atteinte du nerf auditif peut laisser une surdité définitive et incurable ; l'atteinte de la 2e paire une amaurose par atrophie optique. Enfin l'infection ourlienne peut engendrer le tableau d'une myélite transverse ou une radiculonévrite diffuse.

C'est dire dans tous ces cas l'importance d'un diagnostic établi non seulement sur une notion de contagion mais sur des tests biologiques sensibles et spécifiques.

Les réactions sérologiques spécifiques permettent aussi de rattacher certaines manifestations cliniques exceptionnelles à l'infection ourlienne.

Ainsi la néphrite ourlienne, rapportée par MILLER et CATHALA peut revêtir 3 aspects : albuminurie simple et transitoire survenant au cours de la parotidite, néphrite hématurique de bon pronostic, rappelant celle de la scarlatine, néphrite avec anasarque de pronostic plus réservé.

Les arthrites ourliennes décrites déjà par TROUSSEAU se révèlent par des arthralgies localisées à une ou à un petit nombre d'articulations et parfois par des manifestations fluxionnaires (douleurs vives, tuméfaction, épanchement articulaire, fièvre). Leur évolution est subaiguë ; elles guérissent généralement sans séquelles. Des bursites, des synovites ont été observées. Là aussi, le rhumatisme peut précéder la localisation salivaire.

Maintes revues générales sur les pneumopathies virales mentionnent les oreillons parmi leurs causes rares mais la littérature médicale ne contient à notre connaissance que peu de publications précises sur les pneumopathies ourliennes. La fréquente discrétion de leur tableau clinique au cours des oreillons, la nécessité en dehors de toute parotidite de demander un test sérologique pour en affirmer l'étiologie sont les raisons pour lesquelles elles sont méconnues et mal assurées dans leur réalité.

Enfin après la description par WEINBERG et HIMELEARF en 1943 de la fibroélastose de l'endocarde certains auteurs ont suggéré que la forme congénitale de cette anomalie cardiaque pourrait être due à une infection endomyocardique intra-utérine éventuellement ourlienne ; NOREN, ADAMS et ANDERSON ont montré que des enfants atteints de fibro-élastose présentaient une hypersensibilité cutanée à l'antigène ourlien. Mais ces faits demandent confirmation, laquelle ne peut être fournie que par des études biologiques appropriées.

Epidémiologie : L'infection ourlienne évolue le plus souvent sous le mode épidémique dans les collectivités d'enfants, d'adolescents ou

de jeunes adultes, par poussées successives à 3 semaines d'intervalle environ, en fonction même de la durée de la période d'incubation. Entre les épidémies, les oreillons persistent à l'état endémique dans les grands centres. Le sujet infecté est le réservoir de virus, il élimine le virus dans la salive et dans les urines et peut transmettre la maladie six jours avant et 9 jours après le début de l'infection.

-:-

CHAPITRE III

-:-

BILAN ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LE VIRUS OURLIEN

-:-

I - Classification

Le virus ourlien ou Myxovirus parotidis est classé dans le groupe des Myxovirus (ainsi nommés en raison de leur affinité pour certaines mucoprotéines de la paroi des cellules ou des hématies) et plus spécialement dans le sous-groupe des Para Myxovirus qui contient aussi notamment les virus :

parainfluenzae 1, 2, 3, 4
le virus de la maladie de Newcastle
le virus respiratoire syncitial
le virus de la rougeole.

II - Morphologie et constitution chimique

Le virus ourlien apparaît grossièrement sphérique ; sa taille a été déterminée par filtration et mesurée en microscopie électronique ; son diamètre peut varier de 85 mμ à plus de 300 mμ (CAMBELL 1961). Il faut noter aussi l'importance de son polymorphisme ; on n'observe cependant pas de formes filamenteuses.

Comme tout myxovirus, le virus ourlien est constitué d'un acide nucléique de type ribonucléique RNA associé à des protéines pour for-

mer une nucléocapside à symétrie hélicoïdale. Sur la molécule de RNA en hélice viennent s'insérer les unités de structure protéiques, le tout réalisant un long filament cylindrique à périodicité régulière, creux en son centre. Cette nucléocapside est flexible et pelotonnée à l'intérieur d'une enveloppe formée de protéines, de lipides, de polysaccharides. Cette dernière est hérissée de projections cylindriques, correspondant à l'hémagglutinine, régulièrement disposées et mesurant 80 à 100 Å (HORNE, 1960). Cette enveloppe épaisse de 150 à 200 Å est rompue sous l'action de l'éther notamment, ce qui permet la sortie du matériel interne (SCHAFER et ROTT 1959, HORNE 1960) dont les caractéristiques sont celles d'un paramyxovirus. En effet, les structures hélicoïdales ainsi libérées ont une longueur de 3 500 mμ à 5 000 m μ , un diamètre de 180 Å, un canal central de 40 à 50 Å de diamètre, elles présentent une périodicité régulière de 50 Å le long de leur axe. Elles sont formées de protéines et d'environ 10 p.cent de RNA. Le poids moléculaire du RNA est de 8.10^6.

III - Propriétés biologiques

① L'hémadsorption

Comme les autres myxovirus (à l'exception du virus respiratoire syncitial) le virus ourlien provoque le phénomène d'hémadsorption par les cellules qu'il infecte ; ce phénomène fut décrit par VOGEL et SHELOKOV en 1957 ; les globules rouges sensibles, adsorbés sur les cellules infectées dessinent des aspects caractéristiques en grappes, en rosettes.

Cette hémadsorption facilement visible en microscopie optique est précoce et sensible ; elle survient avant tout effet cytopathogène

décelable, elle détecte alors la présence du virus et permet son isolement. Elle est inhibée spécifiquement par un sérum anti-ourlien.

② L'hémagglutination

Comme les autres myxovirus (à l'exception du virus respiratoire syncitial) le virus ourlien possède une affinité pour certaines mucoprotéines des surfaces cellulaires, des surfaces de certaines hématies ou des liquides tissulaires (sérum, urines). Cette affinité est due à un déterminant antigénique de la surface du virion appelé hémagglutinine (bien que le suffixe - ine soit en général réservé aux anticorps). L'hémagglutinine adsorbe le virus au substrat récepteur de la cellule ; par ce mécanisme, les virions forment un pont reliant entre eux les globules rouges possédant les récepteurs correspondants. Les virions peuvent ensuite se libérer spontanément grace à l'intervention d'un de leurs enzymes, la neuraminidase, provoquant la libération d'acide N acétylneuraminique par action sur les récepteurs cellulaires mucoprotéiques.

Ces propriétés hémagglutinantes peuvent être mises en évidence dans le milieu de culture des cellules où se multiplie le virus ou dans les liquides amniotiques et allantoïques d'oeufs embryonnés infectés.

HORNSFALL en 1956 a montré qu'indépendamment des virions infectants, de grandes quantités d'hémagglutinine ourlienne spécifique "non infectieuse" pouvaient être élaborées dans les liquides allantoïques.

Mais ce pouvoir hémagglutinant est souvent masqué par la présence d'inhibiteurs non spécifiques auxquels l'hémagglutinine est très

sensible ; de ce fait les quantités d'hémagglutinine libérées en culture cellulaire restent souvent en deça du taux décelable. L'interaction virus-globule rouge ou hémagglutinine - globule rouge a été discutée par de nombreux auteurs. L'hémagglutinine du virus ourlien est peu active et l'activité enzymatique du virus faible. L'élution à 37° est difficile et les globules rouges restent encore agglutinables par d'autres myxovirus.

Des globules rouges humains ou de poulet traités à 37° par le virus ourlien sont agglutinés par addition de l'antisérum spécifique, ce qui est en faveur d'une union irréversible de certains virions et des globules rouges.

Le virus ourlien agglutine les globules rouges de nombreuses espèces que nous signalons ci-après dans l'ordre d'affinité : poulet et brebis, cobaye, vache et cheval, homme, enfin souris et chat. Pour certains auteurs, toutes les souches de virus n'ont pas les mêmes possibilités dans ce domaine ; en particulier il en est qui n'agglutinent pas les hématies d'homme, de souris, de chat ; cependant il arrive que celles-ci acquièrent cette possibilité après purification et élimination d'inhibiteurs non spécifiques présents dans les préparations virales. En conséquence, la présence d'inhibiteurs affecte en premier l'agglutinabilité des globules de chat, puis de souris et enfin d'homme.

Au sein d'une même espèce, les globules rouges d'individus différents peuvent posséder une affinité variable pour le virus ourlien. La chose est bien démontrée pour les globules de poulet et de brebis. Il est donc indispensable de bien choisir non seulement son espèce mais encore son donneur pour que les tests

d'hémagglutination soient régulièrement reproductibles.

L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante du virus ourlien dépend de la souche virale, des globules rouges utilisés, de la présence ou non d'inhibiteurs. Aucune souche n'agglutine les globules de chat ou de brebis à 37°, la plupart des souches agglutinent les globules de poulet, de cobaye ou d'homme à quelque température que ce soit entre +4° et 37°C.

Dans une étude comparative de diverses hémagglutinines virales, BUCKLAND et TYRRELL décrivent l'action de plusieurs agents physiques et chimiques sur l'hémagglutinine ourlienne et sur les récepteurs globulaires qui lui correspondent.

L'hémagglutinine est active pour des valeurs de pH allant de 5 à 10 ; elle perd progressivement son efficacité lorsqu'elle est maintenue à 56° pendant plus de 20 minutes ou en présence d'urée laquelle détruit les liaisons hydrogène, son activité diminue également en présence de bisulfite et de periodate ; elle est aussi détruite par le formol.

La papaïne ne la modifie pas, mais GRESSER et ENDERS ont montré que l'hémagglutinine ourlienne était détruite par la trypsine à la concentration de 0,5 mg/ml ce qui prouve sa nature protéique.

L'acide parachloromercuribenzoïque qui agit sur les radicaux soufrés, et le desoxycholate sont inactifs sur l'hémagglutinine ourlienne.

Les mêmes auteurs ont étudié également l'action de divers agents sur les récepteurs

globulaires correspondant à l'hémagglutinine ourlienne utilisant pour cela des globules rouges humains de groupe sanguin O et des hématies de mouton.

Le formol à 1 p.cent, la papaïne à 2 p.cent et la chymotrypsine à 0,01 p.cent ne modifient pas les récepteurs spécifiques des globules humains ; par contre la neuraminidase les détruit.

Le bisulfite et l'acide parachloromercuribenzoïque sont inactifs tandis que le periodate détruit les récepteurs globulaires.

③ Activité hémolytique

MORGAN en 1948 met en évidence l'activité hémolytique du virus ourlien ; c'était alors le premier virus pour lequel une telle activité était démontrée. Cette hémolysine est très semblable à celle du virus de Newcastle et du virus Sendaï. L'hémolyse est optima à 37° et ne se produit pas à +4°.

L'hémolysine est distincte de l'hémagglutinine et plus labile que cette dernière ; elle est détruite par la chaleur, le formol, le changement de pH. Cette hémolysine ne serait produite que par des souches récemment isolées de l'organisme, ayant encore un pouvoir cytolytique caractéristique, entraînant la formation de syncitiums en culture cellulaire.

Le traitement des globules rouges par un enzyme détruisant les récepteurs (RDE) rend la cellule résistante à l'action hémolytique du virus ourlien, et cela signifie que l'hémagglutination et l'hémolyse utilisent les mêmes récepteurs.

④ Activité interférante

De nombreux auteurs ont montré l'activité interférante du virus ourlien inactivé ou vivant et l'induction d'interféron dans divers systèmes cellulaires sous l'action des virions. C'est par un équilibre entre la production d'interféron et la production virale que WAGNER explique l'obtention de "cultures porteuses" chroniquement infectées par le virus ourlien. C'est également l'une des explications possibles du phénomène d'auto-interférence observé avec des inoculums massifs : le titre infectant obtenu au cours des passages peut varier jusqu'à 10 000 fois ; les fluctuations de ce titre suivent un schéma bien reproductible : plus courte est la période d'incubation de chaque passage et plus rapide est la baisse de titre. L'inoculum du passage précédant la baisse de titre possède une forte activité interférante. Pour prévenir cette baisse de titre il suffit de diluer l'inoculum.

⑤ Stabilité

Les diverses propriétés du virus ourlien sont inactivées électivement par des agents physiques ou chimiques. Dans l'ensemble il est, comme les autres myxovirus, peu résistant hors de l'organisme ou de la cellule infectée.

Le pouvoir infectieux est conservé à -70° pendant plusieurs mois sans perte de titre et même plusieurs années.

D'après HORSFALL la demi-vie du virus ourlien en suspension dans du liquide allantoïque à 35° in vitro est de 80 minutes. Dans les mêmes conditions, elle est de 8 heures pour CANBELL. A 56° le pouvoir infectieux disparaît

rapidement.

A +4° la stabilité du virus varie selon les souches, selon la composition du milieu de suspension, selon son pH qui doit rester entre 6 et 8,5.

A +4° cependant le titre hémagglutinant est très stable, mais on a parfois constaté sa baisse rapide dans des stocks concentrés de virus ; cette baisse de titre est due à l'agrégation des particules ou à la présence d'inhibiteurs, comme le montre la récupération des titres primitivement obtenus sous l'action des ultrasons.

L'éther, le formol, la β propiolactone, les ultra-violets suppriment son pouvoir infectieux en conservant son pouvoir hémagglutinant.

Les différentes propriétés biologiques du virus ourlien sont détruites par la chaleur ou les rayons ultra-violets dans l'ordre suivant : infectivité, activité interférante, hémolyse, hémagglutination, et pouvoir antigénique de fixation du complément.

⑥ Structure antigénique du virus ourlien

Outre l'hémagglutinine,
l'hémolysine,
la neuraminidase

on peut isoler et identifier les antigènes suivants :

. Un antigène "S" dit soluble car il reste dans le surnageant après ultra-centrifugation. Il est synthétisé dans les cellules infectées et libéré par elles dans le surnageant. On peut l'obtenir aussi après désintégration du virus

par action de l'éther ; il correspond à la nucléocapside séparée des constituants antigéniques de l'enveloppe.

. Un antigène "V" ou viral, lié aux constituants de l'enveloppe, en particulier aux projections de nature protéique. On admet que la couche externe de l'enveloppe serait constituée d'aires juxtaposées possédant les propriétés hémagglutinantes et neuramidasiques et que les structures qui portent ces propriétés seraient liées aux projections. Il est donc probable que l'antigène viral, la neuraminidase, le pouvoir hémagglutinant ne sont pas liés à un seul site antigénique. L'enveloppe contient en outre divers constituants de la cellule dans laquelle le virion s'est multiplié, puis enrobé.

. Un allergène présent dans le liquide allantoïque ou amniotique d'oeuf infecté et qui a été mis en évidence par ENDERS en 1943. Il provoque l'apparition d'une hypersensibilité spécifique de type retardée décelée par injection intradermique d'une suspension de liquide extra-embryonnaire infecté et inactivé par le formol, la chaleur ou les rayons U.V. chez les sujets antérieurement infectés par le virus ourlien.

Des macrophages provenant de la rate de Cobayes sensibilisés et cultivés in vitro se montrent sensibles au virus ourlien inactivé ; celui-ci produit sur les cultures un effet toxique alors qu'il reste sans action sur les macrophages d'animaux normaux ; cet effet cytotoxique est supprimé en présence de cortisone.

Les différents antigènes du virus ourlien ne sont donc pas encore tous isolés et caractérisés de façon certaine, cependant il est important de noter qu'un seul type antigénique de virus ourlien est actuellement connu.

Le problème se pose aussi de savoir s'il existe entre le virus ourlien et les autres myxovirus des communautés antigéniques. KILHAM d'une part et JORDAN et FELLER d'autre part rapportent certaines analogies avec le virus de la maladie de Newcastle ; en effet les sérums de sujets convalescents d'oreillons présentent également une montée du taux des anticorps fixant le complément et inhibant l'hémagglutination pour le virus NDV (de la maladie de Newcastle). De même, DE MEIO et WALKER rapportent des réactions sérologiques croisées entre le virus ourlien et les virus para influenzae.

Cependant des sérums d'animaux immunisés expérimentalement soit par le virus ourlien, soit par le NDV, soit par les virus para influenzae ne réagissent qu'avec le type de virus inoculé.

Ces réactions sérologiques hétérologues, dont la fréquence augmente d'ailleurs avec l'âge des populations examinées (LENNETTE et JENSEN) semblent correspondre à des réactions anamnestiques chez des sujets antérieurement infectés par les virus correspondants.

Aucune relation antigénique n'a été trouvée avec le virus respiratoire syncitial ou avec le virus de la rougeole.

⑦ Pouvoir pathogène expérimental

On a pu reproduire la maladie ourlienne chez

le singe, l'observer chez le chien domestique (NOYCE 1959), obtenir une infection transmissible après adaptation au hamster nouveau-né, à la souris, au rat. KILHAM par voie intracérébrale chez ces animaux nouveau-nés a pu obtenir une souche neuro virulente provoquant une encéphalite mortelle. BURR et NAGLER par inoculation intranasale au hamster ont réussi le passage en série du virus qui fut retrouvé dans les poumons des animaux.

Mais ce pouvoir pathogène expérimental reste sans intérêt pratique pour le diagnostic. Par contre l'infection inapparente du cobaye permet d'obtenir de bons sérums de référence.

⑧ Culture, isolement et multiplication du virus ourlien

La culture du virus ourlien est réalisée soit en oeuf embryonné, soit en cultures cellulaires.

. La culture en oeuf de poule embryonné

Il convient de choisir des embryons de 7 à 8 jours; plus jeunes ils meurent sans avoir produit de titres élevés, plus vieux ils sont moins sensibles.

Ces oeufs embryonnés sont inoculés dans la cavité amniotique de préférence, mais peuvent l'être également dans la cavité allantoïque ou dans le sac du jaune. Ils sont incubés à 35° et récoltés entre le 5e et le 7e jour après l'inoculation. A cette date, l'oeuf est généralement vivant. On prélève le liquide amniotique pour y déceler la présence d'hémagglutinine active sur les hématies de poulet ou de cobaye. Elle est parfois présente au premier passage, mais dans le cas contraire, il est par-

fois nécessaire de pratiquer systématiquement un second puis un troisième passage avant de la déceler.

Cette hémagglutinine est reconnue spécifique des oreillons si elle est inhibée par un sérum de référence.

Le virus se développe dans les cellules bordantes du sac amniotique, dans l'épiderme de l'embryon, dans les muqueuses du pharynx et des bronches. L'embryon inoculé au 8e jour permet la multiplication virale pendant 5 à 6 jours, puis le titre viral diminue et l'embryon survit ; il supprime donc l'infection alors qu'il est encore incapable de fabriquer des anticorps. Une forte proportion d'embryons infectés ayant survécu présente des anomalies et en particulier des cataractes.

La sensibilité des oeufs varie suivant les lots et suivant les saisons. La production d'hémagglutinine dépend en outre de l'inoculum. Au cours des passages en série on note des importantes fluctuations du titre infectant et de la production d'hémagglutinine non infectante.

. La multiplication du virus dans les cultures cellulaires

Beaucoup de cellules en culture sont sensibles au virus ourlien : cellules humaines de primo explantation, cellules amniotiques, cellules de lignée continue Kb ou Hela, cellules rénales de Singe de primo explantation, en tenant compte dans cette dernière éventualité de la présence toujours possible de myxovirus simiens latents en particulier SV 5.

L'adaptation aux cultures cellulaires d'une souche cultivée en oeuf embryonné est diffici-

le, voire impossible à obtenir : l'inoculation de liquide d'oeufs infectés sur culture cellulaire produit souvent un effet toxique non transmissible.

Par contre, la multiplication du virus en culture cellulaire est facilement obtenue lors de l'isolement d'une souche à partir d'un produit pathologique. C'est donc la méthode la plus sensible.

On peut inoculer soit la salive parotidienne ou totale prélevée dans les 8 premiers jours de la maladie, soit du LCR dans les 3 à 6 jours qui suivent l'apparition du syndrome méningé, soit encore des urines. UTZ a montré que cette virurie pouvait être très prolongée et persister jusqu'au 15e jour après le début de la maladie.

Enfin l'existence d'une virémie a été prouvée par deux auteurs différents (OVERMANN et KILHAM). Précoce, elle ne permet pas l'isolement au delà de la 48e heure, mais elle pourrait expliquer la physiopathologie de la maladie.

En période d'incubation, l'isolement est également possible à partir de la salive. Une observation de deux malades, le frère et la soeur permit l'isolement du virus de la salive 7 jours avant l'apparition de la parotidite chez le garçon contaminé par sa soeur, parotidite qui apparut 18 jours après celle de sa soeur. Des expériences faites chez des volontaires auxquels on administrait le virus ourlien par voie buccale ont permis l'isolement du virus dans la salive 6 jours avant l'apparition de toute parotidite, précisant ainsi la période de contagiosité de la maladie (HENLE).

Des lésions caractéristiques de l'infection par un paramyxovirus apparaissent dans la culture cellulaire en 48 h à 3 jours. Ce sont des syncitiums ou cellules géantes multinuclées dont CHANY et coll. ont montré qu'elles se forment à partir d'une cellule parasitée qui développe à sa périphérie une activité diverticulaire importante et englobe peu à peu les cellules saines qui l'entourent selon un processus de cytophagie. Ce phénomène qui est indépendant de la multiplication virale, des propriétés hémagglutinantes et hémolytiques, serait lié à la formation d'une substance intracellulaire synthétisée pendant la période d' éclipse du cycle viral. En une semaine, la couche cellulaire est détruite. Si la multiplication virale est le plus souvent associée à cet effet syncitial, elle peut exister en l'absence de la formation de cellules géantes; c'est ainsi que l'effet cytopathogéne provoqué par le virus ourlien sur cellules amniotiques humaines est double : d'une part des cellules allongées, effilées, d'autre part des cellules géantes multinuclées ; un des deux aspects peut prédominer sur l'autre (GRESSER et ENDERS 1961).

La multiplication virale s'accompagne de la formation de volumineuses inclusions acidophiles intracytoplasmiques visibles parfois même dans une cellule en mitose. On ne les observe pas en cellule d'embryon de Poulet contaminé.

L'identification du virus isolé exige :

. soit la neutralisation spécifique de cet effet cytopathogène par un sérum de référence,

. soit l'inhibition de l'hémagglutinine produite dans le liquide qui baigne la culture cellulaire,

. soit l'inhibition de l'hémadsorption des globules rouges de poulet ou de cobaye à la culture infectée.

Les techniques d'immunofluorescence permettent également de déceler la multiplication virale intracellulaire. Des cultures cellulaires en tubes à lamelle (cellules thyroïdiennes ou cellules rénales de Singe) inoculées avec le virus sont, après fixation, mises en contact soit avec un immun sérum ourlien puis avec un sérum antiglobulines selon la classique technique indirecte de COONS, soit directement avec des anticorps ourliens marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

La fluorescence à l'intérieur des cellules se manifeste dès la 17e heure après l'ensemencement viral sous forme de granules cytoplasmiques dans quelques cellules groupées en petits foyers isolés au sein de la culture. Dans les heures suivantes, le nombre de cellules atteintes augmente et les inclusions cytoplasmiques sont plus volumineuses ; à la 24e heure ces dernières apparaissent en couronne autour du noyau ; à la 48e heure la majorité des cellules est infectée et la fluorescence apparaît diffuse, étendue à tout le cytoplasme.

Les inclusions sont donc uniquement cytoplasmiques.

C'est par cette technique d'immunofluorescence que la mise en évidence du virus dans les cellules est la plus précoce. (en effet l'hémadsorption n'est manifeste qu'après 24 heures, les syncitiums n'apparaissent qu'en 2 ou 3 jours et les inclusions cytoplasmiques éosinophiles ne sont colorables par l'hémalun-éosine qu'au 4e jour).

La réaction d'immunofluorescence est très

spécifique ; il n'y a pas de réaction croisée, ni avec les virus parainfluenzae 1, 2, 3 ni avec le virus de la rougeole ou celui de la maladie de Newcastle. Elle peut donc être utilisée pour mettre en évidence le virus ourlien au sein de cellules en culture inoculées à partir de salive ou de liquide céphalo-rachidien prélevés dans les premiers jours de la maladie.

⑨ Diagnostic indirect de l'infection ourlienne

En l'absence d'isolement du virus ourlien à partir d'un produit pathologique, le diagnostic de l'infection est possible grâce à divers tests. Il est des épreuves non spécifiques n'ayant qu'une valeur d'orientation, auxquelles on a cependant recours en l'absence de données plus valables.

C'est la recherche du taux d'amylase sanguin ou urinaire. Pour chaque technique de titrage de l'amylasémie ou de l'amylasurie, on peut définir un titre correspondant à une forte présomption d'infection ourlienne. Les meilleurs résultats sont obtenus en cas d'atteinte parotidienne, c'est-à-dire là où le diagnostic est généralement facile. C'est également en cas d'atteinte parotidienne que l'examen cytologique de la salive révèle la présence d'éléments très polymorphes : cellules épithéliales altérées, macrophages, polynucléaires.

D'une toute autre valeur est la mise en évidence d'une montée d'anticorps sériques. Trois types de réactions peuvent être utilisés :

1) La réaction de fixation du complément
Elle sera effectuée avec un antigène obtenu à partir de liquides allantoïques infectés.

On peut utiliser :

soit l'antigène V purifié, capable de déceler des anticorps qui apparaissent vers le 5e jour atteignent un titre élevé et persistent des années peut être même définitivement,

soit l'antigène S purifié, décelant des anticorps très précoces, dès le 3e jour, qui atteignent un titre faible et disparaissent rapidement. Leur détection signe donc une infection ourlienne récente certaine.

Plus souvent, en fait, l'antigène est un liquide brut, mélange d'antigènes soluble et viral.

2) La réaction d'inhibition de l'hémagglutination

Celle-ci fut appliquée au diagnostic des oreillons pour la première fois en 1949 par ROBBINS, KILHAM, LEVENS et ENDERS. Les anticorps inhibant l'hémagglutination apparaissent dès le 5e jour, s'accroissent rapidement ; au 15e jour on ne trouve jamais un titre inférieur au 1/128e ; ils ne disparaissent qu'au bout de plusieurs années. Cette technique permet de titrer les sérums anticomplémentaires. Elle n'a jusqu'à présent été que peu employée. Sa réalisation se heurte à deux difficultés : l'existence d'inhibiteurs non spécifiques gênant l'obtention de l'hémagglutinine, le choix d'un bon donneur de globules rouges.

3) La réaction de neutralisation qui met en jeu des anticorps définitifs. Mais elle est peu pratique parce que longue et difficile.

Quelle que soit la réaction utilisée la preuve d'une infection ourlienne est établie par la constatation d'une apparition ou d'une aug-

mentation significative des anticorps démontrée par la comparaison de deux sérums prélevés l'un au début de la maladie, l'autre 10 à 15 jours plus tard.

Toutefois un titre élevé d'anticorps fixant le complément dans un sérum même isolé est en faveur d'une infection récente, sans oublier cependant qu'un sujet infecté par le virus ourlien peut élaborer des anticorps réagissant avec d'autres paramyxovirus du fait d'un phénomène de rappel.

L'épreuve cutanée d'hypersensibilité n'est pas utilisée en pratique pour le diagnostic car sa positivité est tardive (vers la 3e ou 4e semaine) et durable ; elle peut fausser les résultats des réactions sérologiques car chez un sujet immun elle provoque une décharge d'anticorps et joue le rôle d'un vaccin de rappel. Sa négativité permet de dépister les sujets susceptibles de contracter la maladie et de déterminer ainsi ceux qu'il faut vacciner.

(10) Prévention

La prévention spécifique passive des localisations les plus graves : orchite, méningite, pourrait être obtenue en injectant des immunoglobulines de sujet hyperimmunisé dès le premier jour de la parotidite, à doses suffisantes; pratiquée au cours de la première semaine qui suit le contage, elle pourrait réduire l'infection à une forme abortive. Mais il n'en existe pas dans le commerce. Par contre, la vaccination a été largement expérimentée soit par un vaccin inactivé, soit par un vaccin atténué.

La souche Jeryll 9 MV de HILLEMAN atténuée par passages sur oeuf embryonné puis sur culture de cellules d'embryon de Poulet, est injectée par voie sous cutanée sans inconvénient et protège efficacement les individus ainsi vaccinés ; elle peut être associée au vaccin rougeoleux vivant atténué.

CHAPITRE IV

-:-

MATERIEL ET METHODES UTILISEES DANS CE TRAVAIL

-:-

Dans le but de réaliser une sérologie par inhibition de l'hémagglutination à des fins diagnostiques nous avons tenté d'isoler en culture cellulaire une souche de virus ourlien productrice d'hémagglutinine et de codifier la technique d'hémagglutination et d'inhibition de cette hémagglutination.

I - Les cellules vivantes utilisées

Nous avons utilisé dans ce travail deux types de cellules en culture :

- Les cellules rénales de singe de primo-explantation
- une lignée continue nommée B.S.C.

① Les cellules rénales de Singe de primo-explantation

Elles nous sont fournies chaque semaine par l'Institut Pasteur sous forme d'une suspension de 100 ml. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris et dispersé dans le milieu de croissance dont la composition est la suivante :

- Milieu de Eagle (Eurobio) à concentration double d'acides aminés et de vitamines enrichi de 10 p.cent de tryptose autoclavé (tryptose phosphate growth Difco ou E.D.T.),

- 10 % de sérum de Veau décomplémenté,
- 100 unités de pénicilline,
- 200 µg de kanamycine par millilitre
- Al Cl_3 à concentration finale de 0,2 mM pour inhiber certains virus latents capables de contaminer les cultures.

La suspension cellulaire ainsi obtenue contient environ 400 000 cellules/ml. ; elle est distribuée selon les besoins soit en tubes de diamètre 12 mm sous volume de 1 ml, soit en flacons plats de 250 ml. sous volume de 20 ml, soit en boîtes de Roux sous volume de 80 ml.

Après avoir gazé ces récipients avec un mélange d'air et de CO_2 (air : 96 p.cent + CO_2 : 4 p.cent) ils sont déposés à plat dans une étuve à 36°.

Au troisième jour des îlots cellulaires sont visibles et le 5e jour une couche cellulaire continue est obtenue. Le milieu de croissance est alors remplacé par un milieu de survie (le même que précédemment mais privé de sérum et de Al Cl_3) et les cultures sont prêtes pour l'inoculation.

② Les cellules de la lignée B.S.C.

Cette lignée nous a été obligeamment fournie par le Professeur CHANY en 1965 et depuis elle a été entretenue au laboratoire de virologie de l'Hôpital Claude Bernard où elle est de plus conservée congelée dans l'azote liquide.

Le B.S.C. est une lignée de cellules rénales de cercopithèque éthiopien qui a été établie par HOPPS en 1963. Elle est dépourvue de virus contaminant et notamment de virus S.V. 40 mais elle reste sensible à une gamme assez étendue de virus.

Constituée de cellules en grande majorité épithéliales, elle conserve son caractère diploïde (60 chromosomes) jusqu'au vingtième passage ; ensuite apparaissent des cellules à 59, puis 58 chromosomes, en quantité croissante avec le nombre des passages ; cependant la souche conserve une bonne sensibilité aux différents virus jusqu'au 75e passage environ; au delà elle prend les caractères d'une lignée continue et les cellules deviennent hétéroploïdes.

Le milieu de croissance utilisé est le même que pour le rein de Singe de primo explantation. Cependant la multiplication cellulaire est plus rapide ; en 2 jours une couche monocellulaire continue est obtenue et la culture doit être dédoublée, chaque flacon permettant alors de préparer deux nouveaux flacons ou une quarantaine de tubes contenant un millilitre de milieu. Ces derniers sont utilisés après 24 ou 48 heures de culture, jamais au delà. Le milieu de survie contient 2 p.cent de sérum de Veau.

II - L'isolement et l'identification de la souche de virus ourlien hémagglutinante

L'isolement du virus ourlien sur lequel nous avons travaillé a été pratiqué chez un garçon de 12 ans C... François admis dans le service du Professeur MOLLARET à l'Hôpital Claude Bernard pour une parotidite bilatérale qui succè-

dait avec un délai de quelques jours à un syndrome méningé à réaction lymphocytaire. Le diagnostic clinique d'oreillons ne faisait aucun doute.

Le prélèvement fut effectué au niveau de l'orifice du canal de Stenon dont l'aspect était très inflammatoire, rouge et turgescent. Un écouvillon stérile, préalablement trempé dans la solution d'antibiotiques utilisée pour les cultures cellulaires est frotté énergiquement contre la muqueuse entourant l'orifice du canal et immédiatement déchargé dans un tube contenant 2 ml de milieu EDT. A partir de ce milieu de transport et sous volume de 0,1 ml, plusieurs tubes de cultures cellulaires des deux types utilisés sont directement inoculés puis placés à l'étuve, à 36°.

L'aspect de la couche cellulaire est ensuite examiné chaque jour au microscope inversé, à faible grossissement, à travers la paroi de verre, comparativement à des tubes témoins non inoculés.

Le 3e jour, nous constatons dans la couche de cellules B.S.C. l'apparition de zones vitreuses où toute refringence a disparu et où les limites cellulaires ne sont plus discernables. Le 4e jour, cet aspect évocateur de cellules géantes est confirmé et nous notons également son apparition dans les tubes de cellules rénales de singe de primo-explantation. Dans les jours qui suivent cet effet cytopathogène s'étend ; il y a rupture des cellules géantes dont les bords se rétractent en une masse granuleuse très réfringente à contours souvent festonné.

Les plasmodes formés sur ces cultures de cellules rénales de Singe présentent très rapidement de nombreuses vacuoles et l'étude des modifications provoquées par le virus isolé doit être rapidement abandonnée en raison du risque de transport d'un virus latent vacuolisant, provenant du singe ; cependant, les cellules témoin non inoculées sont apparemment intactes.

Sur cellules B.S.C. l'effet cyto-pathogène est précoce, très caractéristique d'une infection par un paramyxovirus; au 6e jour, la couche cellulaire est entièrement envahie et les tubes d'isolement sont congelés à -30°.

Afin de reproduire les lésions cellulaires obtenues et d'observer la transmissibilité de l'agent infectant, le surnageant du tube d'isolement est inoculé sur plusieurs tubes de cellules B.S.C. de 48 heures aux dilutions -1, -2, -3.

Au bout de 48 heures, des cellules géantes apparaissent en premier dans le tube inoculé à la dilution -2, puis 24 heures après dans le tube inoculé à la dilution -3. Mais alors que dans le tube inoculé à -2 on va voir l'effet cytopathogène régresser et les cellules reconstituer le 3e jour une couche cellulaire continue, le tube inoculé à -3 va être progressivement et totalement détruit en 5 jours. Dans le tube inoculé avec la dilution -1, aucun effet cytopathogène n'apparaît même après plusieurs jours d'observation ; il est certain que l'inoculum massif non dilué freine l'apparition de l'effet cytopathogène ; cependant des passages réalisés à l'aveugle avec le surnageant de ces tubes négatifs nous ont donné des résultats positifs, traduisant la présence du virus.

Au cours de ces passages en série des tubes de Leighton (tubes présentant une surface plane sur laquelle repose une lamelle) furent inoculés puis après observation de l'effet cytopathogène syncitial, fixés et colorés. La fixation est faite au liquide de Bouin après rinçage des cellules dans un tampon phosphate (P.B.S.). Après quelques heures, la lamelle supportant la culture cellulaire est retirée du tube de Leighton et colorée par une coloration classique à l'hématoxyline-éosine.

Après les bains d'alcool, puis de xylol la lamelle est montée sur lame dans le baume du Canada.

L'observation des lésions est alors caractéristique d'un effet cytopathogène de paramyxovirus. Au petit grossissement, la couche cellulaire est constellée de nombreuses cellules géantes de taille variable contenant de vingt à trente noyaux en moyenne ; ceux-ci sont accolés les uns aux autres en amas périphérique ou central, parfois en bande traversant le syncitium. A leur proximité ou au bord de la cellule géante on peut voir des inclusions cytoplasmiques éosinophiles, de taille variable séparées par un halo blanc du reste de la nappe cytoplasmique qui apparaît rose pâle.

En vue d'établir le rapport de cause à effet existant entre le paramyxovirus isolé et la maladie ourlienne, nous avons titré le pouvoir neutralisant pour l'agent isolé de deux sérums recueillis l'un 24 heures après le prélèvement salivaire, l'autre 7 jours plus tard et démontré l'apparition et l'ascension des anticorps de moins de ½ à 1/64e.

Dans le même temps, le sérum d'un adulte ayant des antécédents ourliens nets remontant à plusieurs années neutralisait à 1/16e. Nous avons également commandé un sérum de référence antiourlien spécifique préparé sur Cobaye à Bethesda "Microbiologic Associatis Inc."; il neutralise 100 doses infectantes pour cultures cellulaires du virus isolé au titre de 1/512e.

Il nous est donc permis d'affirmer que notre souche est bien une souche de virus ourlien.

III - Modalités de la réaction de séro-neutralisation

Principe

Cette réaction est basée sur la neutralisation spécifique du pouvoir infectieux du virus ourlien par des anticorps dits neutralisants présents dans le sérum des sujets ayant des antécédents d'oreillons, ou dans un sérum de référence anti-ourlien.

Les dilutions progressivement croissantes des sérums à expertiser sont mises en contact avec, par tube, 100 doses infectantes du virus ourlien isolé dans notre laboratoire ; les mélanges ainsi obtenus sont inoculés sur des cultures cellulaires B.S.C.

Les jours suivants, l'apparition de l'effet cytopathogène est le témoin de la multiplication virale ; à l'opposé, l'absence de lésion prouve la neutralisation du virus par les anticorps sériques spécifiques. Pour établir le diagnostic d'infection ourlienne il convient de pratiquer simultanément le dosage sur un premier sérum ou sérum précoce prélevé le plus tôt possible au début de la maladie et sur un second sérum ou sérum tardif prélevé dix jours plus tard environ ; seule une élévation significative du taux d'anticorps possède une valeur diagnostique.

Matériel

. les sérums : les sérums sont décantés à partir du prélèvement sanguin coagulé, recueilli dans un tube stérile et sont conservés à +4° si nécessaire ; ils peuvent également être conservés plusieurs mois sous congélation à -30°. Ils sont décomplémentés par chauffage à 56° pendant une demi-heure.

. les cellules : les cellules utilisées proviennent de la souche B.S.C. Les tubes de culture préparés à partir d'une quantité suffisante de cellules (30.000 à 50.000 cellules par tube) présentent en 48 heures une couche cellulaire continue. Le milieu de croissance est alors changé avant l'inoculation remplacé par le milieu de survie constitué d'une solution E.D.T. enrichi de 2 p.cent de sérum de Veau.

. le virus : la réaction de séroneutralisation exige le titrage préalable du pouvoir infectant du virus vis-à-vis du système cellulaire choisi. Des dilutions successives du virus inoculées sur 4 tubes de B.S.C. permettent de définir la dose infectieuse à 50 p.cent

ou plutôt la dose provoquant un effet cytopathogène dans 2 des 4 tubes. En pratique on introduit le virus à la dose fixe de 100 doses E.C.P. 50 et nous avons dû effectuer nos titrages avec un stock de virus à la dilution -3 dans la solution E.D.T.

Technique de la réaction

On réalise d'abord une dilution des sérums dans la solution E.D.T. selon une progression géométrique de raison deux et sous volume de 0,2 ml. On obtient ainsi une gamme partant du sérum pur et allant jusqu'au sérum dilué au 1/128e.

A chaque dilution, on ajoute ensuite 0,2 ml de la suspension virale diluée à -3.

Après agitation, ces mélanges de virus et de sérums sont incubés à 37°, pendant une heure.

Puis les systèmes cellulaires sont inoculés; deux tubes de B.S.C. reçoivent chacun 0,2 ml d'un mélange (virus à dose fixe et sérum à une dilution donnée variable). Le dosage de chaque paire de sérum nécessite donc deux séries de 16 tubes de cultures cellulaires, les dilutions finales pour chacun des deux sérums allant du 1/2 au 1/256. On inocule d'autre part 4 tubes de B.S.C. avec 0,1 ml de la suspension virale d'origine à -3, dans 0,9 ml de milieu, ce qui donne une dilution finale du virus à -4, comme dans chacun des autres tubes. Ce sont les témoins-virus. On conserve également 2 tubes de B.S.C. comme témoins-cellules.

La lecture s'effectue à partir du deuxième jour, en règle le troisième et le cinquième jour, date à laquelle l'effet cytopathogène

(présence de syncitiums) est facilement observable au microscope inversé, à faible grossissement.

Le titre des anticorps neutralisants est donné par la dilution du sérum correspondant au dernier tube dans lequel l'effet cytopathogène est inhibé à plus de 50 p.cent par rapport à celui obtenu chez les témoins-virus : quelques rares cellules géantes peuvent alors être observées. Aux dilutions inférieures, aucune lésion n'est visible, le virus ayant été neutralisé totalement par les anticorps sériques qui lui correspondent.

IV - Titrage des anticorps sériques par fixation du complément

REACTIFS

- Diluant

Toutes les dilutions sont effectuées dans la solution tampon de Mayer à pH 7,2.

- Sérum

Les sérums à examiner sont décomplémentés par chauffage à 56° pendant 30 minutes (ils peuvent être conservés à +4° ou à -30° pendant plusieurs mois).

- Antigène

L'antigène spécifique utilisé est celui préparé par l'Institut Pasteur à partir de liquide allantoïque d'oeufs de Poule embryonnés, inoculés avec le virus ourlien. Lyophilisé, il est conservé à +4°, et remis en suspension au moment de l'emploi dans 2 ml d'eau distillée.

Un antigène témoin l'accompagne, préparé à

partir de liquide allantoïque normal et destiné à vérifier que les sérums des malades ne réagissent pas de façon non spécifique avec le liquide allantoïque.

- Hématies de mouton

Fournies, lavées et stabilisées en suspension à 50 p.cent (Institut Pasteur) elles sont utilisées à la dilution de 2 p.cent dans le Tampon de Mayer.

- Sérum hémolytique anti-hématies de mouton

Préparé par l'Institut Pasteur après hyperimmunisation de lapins contre les hématies de mouton, son titre est de 10.000 unités/ml ; il est utilisé après dilution de telle sorte que 0,1 ml contienne 3 unités hémolytiques.

La suspension d'hématies de mouton à 2 p.cent et le sérum hémolytique dilué à 3 unités pour 0,1 ml sont ensuite mélangés à parties égales. L'ensemble constituant le système hémolytique.

- Complément

Nous utilisons le complément lyophilisé de l'Institut Pasteur, préparé à partir de sérum de cobayes, et reconstitué après addition de 0,5 ml du dissolvant spécial.

REACTION

Le dosage des anticorps ourliens fixant le complément comporte deux stades.

- Le titrage préalable du complément

Celui-ci est pratiqué avec le complément reconstitué, dilué au 1/50e dans le tampon de Mayer. Il est indispensable car il permet d'ajuster le système hémolytique. Les différents éléments du titrage sont répartis suivant le tableau suivant :

tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
complément au 1/50 en ml	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
tampon de Mayer	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	1
Antigène ou tampon	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

30 minutes au bain marie à 37°

GR à 2 %	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sérum hémolytique à 3 u/0,1ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

30 minutes au bain marie à 37°

Dilution à utiliser pour la réaction	1/250	1/166	1/125	1/100	1/83	1/71	1/62	1/55	1/50

L'antigène peut être remplacé par le tampon de Mayer car il est dépourvu de tout pouvoir anticomplémentaire.

Le titre à utiliser est donné par le tube contenant la plus petite quantité de complément ayant provoqué l'hémolyse totale, ce tube contient par définition une unité hémolytique de complément.

On calcule la dilution $\frac{1}{x}$ du complément à utiliser afin que la solution obtenue renferme 2 unités de complément dans 0,2 ml d'après la formule suivante :

$$\frac{1}{x} = \frac{2}{\frac{0,2}{a}} \times \frac{1}{b}$$

a étant la plus petite quantité de complément dilué ayant provoqué l'hémolyse totale

b étant la dilution initiale du complément.

Pour rendre ce dosage plus facile et surtout précis nous l'avons effectué sous volume assez important avec une quantité de globules rouges de mouton et de sérum hémolytique 5 fois plus grande que celle qui sera nécéssaire dans le dosage proprement dit.

La dilution du complément à utiliser est donc :

$$\frac{1}{x} = \frac{\frac{2}{\frac{0,2}{a}} \times \frac{1}{b}}{5}$$

- La réaction proprement dite

Le sérum à examiner est dilué dans le tampon de Mayer selon une progression géométrique de raison 2, à partir du sérum inactivé dilué au 1/10e.

Les réactifs sont répartis selon le tableau ci-après dans des plaques de plexiglas à 80 godets à fond rond.

Les godets 1 à 5 correspondent à la réaction proprement dite (antigène spécifique). S'ils sont hémolysés la réaction est négative, sinon, on note la plus grande dilution du sérum empêchant l'hémolyse.

Si le dernier godet au 1/160e n'est pas hémolysé, on peut refaire le dosage en poursuivant les dilutions du sérum.

Le titre est donné par le dernier godet où l'hémolyse n'est pas totale.

Il est toujours préférable de pratiquer la réaction sur deux sérums, l'un précoce, l'autre prélevé 10 à 14 jours plus tard.

Un taux d'anticorps au 1/10e ou 1/20e est considéré comme négatif car une affection ancienne peut laisser subsister ce taux.

Le résultat n'est considéré comme positif qu'à partir de 1/40e et au delà. Mais le meilleur critère de positivité du séro-diagnostic ourlien est une différence de titre d'au moins 2 godets entre le premier et le deuxième prélèvement.

Les godets 6 et 7 contiennent l'antigène témoin, ils doivent toujours hémolyser sinon la réaction serait ininterprétable.

godets	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
dilution	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/10	1/20	1/10	1/20				
sérum (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1				
antigène spécifique	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1					0,1			
antigène témoin						0,1	0,1				0,1		
diluant								0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4
complément (2 u)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	

18 à 24 heures à +4°

GR à 2% et sérum hémolytique à 3u/0,1ml à volume égal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

bain marie à 37° jusqu'à hémolyse des témoins

Les godets 8 et 9 sont les témoins sérum qui doivent hémolyser, sinon le sérum est dit anticomplémentaire.

Le godet 10 est le témoin antigène spécifique.

Le godet 11 est le témoin antigène-témoin.

Le godet 12 est le témoin des hématies sensibilisées.

Le godet 13 est le témoin globules.

Ces 4 godets sont des témoins de série qui ne se font qu'une seule fois pour une série de sérums à examiner. Tous doivent présenter une hémolyse sauf le troisième godet, où les hématies sédimentent.

-:-

CHAPITRE V

-:-

LA PREPARATION DE L'HEMAGGLUTININE

-:-

La production d'hémagglutinine ourlienne a été recherchée dans les surnageants des différents passages de notre agent infectant sur cellules B.S.C.

Pour ces premiers essais empiriques nous avons utilisé les hématies dont nous disposions au laboratoire (hématies de pigeon dont nous nous servions pour la sérologie de la rubéole, hématies de singe rhésus dont nous nous servions pour la sérologie de la rougeole).

Dès le 3e passage, trois jours après son inoculation nous avons mis en évidence dans le surnageant des cellules inoculées une hémagglutinine titrant 16 unités dans 0,2 ml pour les hématies de singe rhésus alors qu'aucune hémagglutination n'était observée dans les mêmes conditions avec le surnageant des cellules B.S.C. témoin non inoculées.

Il nous restait à étudier les facteurs intervenant dans la production de cet antigène et les modalités de son inhibition spécifique par les anticorps.

I - Modalités techniques utilisées pour la préparation de l'hémagglutinine

L'hémagglutinine ourlienne est préparée cou-

rammentau laboratoire soit sur les cellules rénales de singe de primo-explantation, soit sur les cellules B.S.C., parfois en flacons de 250 ml, plus souvent en boîtes de Roux.

Les flacons sont inoculés quand la couche cellulaire est continue, pour le B.S.C. 48 heures après la mise en culture, pour les cellules rénales de singe de primo-explantation après 4 ou 5 jours.

Lors de l'inoculation virale, le milieu surnageant est retiré, les cellules rincées avec une solution tamponnée phosphatée, puis l'inoculum est déposé sur les cellules. Il est dilué au préalable de telle sorte que l'on dépose environ 2.000 unités formant plage sous volume de 1 ml à la surface des cellules d'un flacon de 250 ml et environ 10 000 U.F.P. sous volume de 2 ml sur les cellules d'une boîte de Roux ; il est régulièrement réparti sur les cellules par inclinaison du flacon. L'apport d'une atmosphère à 96 p.cent d'air et 4 p.cent de gaz carbonique est assurée pour maintenir le pH voisin de la neutralité pendant l'adsorption dont la durée est de 30 à 60 minutes à la température de 37°. Les cellules sont alors recouvertes du milieu de survie contenant 2 p.cent de sérum de veau. 48 heures après, ce milieu est renouvelé et son volume réduit aux trois quarts. Dès le 4e jour le surnageant peut être recueilli et possède des propriétés hémagglutinantes spécifiques avec un titre moyen de 16 à 32 U.H dans 0,2 ml. Un nouveau milieu de survie apporté au 4e jour, permet de garder la culture 48 heures de plus. Au 6e jour, l'effet cytopathogène est étendu, les cellules se détachent du verre par agitation et le tout peut être congelé.

Après 3 cycles successifs de congélation décongélation et centrifugation rapide pour éliminer les débris cellulaires un deuxième lot d'hémagglutinine est obtenu. Son titre est fréquemment de 8 à 16 U.H. dans 0,2 ml.

Cette technique régulièrement reproductible a été codifiée après l'étude des principaux facteurs susceptibles d'intervenir dans la production de l'hémagglutinine ourlienne.

II - Etude de quelques facteurs pouvant intervenir dans la production de l'hémagglutinine ourlienne

1er facteur : l'importance de l'inoculum :

Nous avons inoculé parallèlement des flacons de B.S.C. avec 100 ou 1.000 unités formant plage (U.F.P.)

inoculum	3e jour	5e jour
100 U.F.P.	4 U.H/0,2 ml	16 U.H
1 000 U.F.P.	8 U.H	16 U.H

A plusieurs reprises, nous avons obtenu un résultat quasi équivalent ; ce n'est que lorsque l'inoculum était très faible (de l'ordre de 10 U.F.P.) ou au contraire très élevé que nous avons obtenu des titres hémagglutinants très faibles, de l'ordre de 1/2, sans généralisation de l'effet cytopathogène.

2e facteur : la présence de sérum dans le milieu de survie

Trois flacons de B.S.C., âgés de 48 heures sont inoculés avec 100 U.F.P. de virus ourlien.

. Après une heure d'adsorption, on ajoute dans le premier flacon le milieu de survie suivant :

20 ml d'E.D.T. + 10 p.cent de sérum de veau

dans le 2e flacon, le milieu suivant :

20 ml d'E.D.T. + 2 p.cent de sérum de veau

dans le 3e flacon, on ajoute 20 ml d' E.D.T. sans sérum.

48 heures après, les milieux sont renouvelés avec dans chaque cas un milieu de composition identique à celui qui est retiré. Les résultats obtenus, consignés dans le tableau ci-dessous montrent que la présence de sérum de veau n'a modifié en rien le titre de l'hémagglutinine produite bien que l'effet cytopathogène soit plus important et plus rapide en l'absence de sérum, plus syncitial en présence de 10 p.cent de sérum de veau.

	milieu sans sérum de veau	milieu avec 2% de sérum de veau	milieu avec 10% de sérum de veau
3e jour	2 U.H	2 U.H	2 U.H
4e jour	4 U.H	4 U.H	4 U.H
5e jour	4 U.H	4 U.H	4 U.H
6e jour	8 U.H	8 U.H	8 U.H

3e facteur : la température d'incubation

Trois flacons de B.S.C. de 48 heures sont inoculés avec 100 U.F.P. ; après adsorption pendant une heure, on ajoute dans chaque fla-

con 20 ml de milieu de survie et chacun de ces flacons est placé respectivement à 35°, 37° et 40°. 48 heures après les milieux sont renouvelés ; un échantillon de chaque surnageant sera prélevé les jours suivants et titré. Les résultats des titrages sont donnés dans le tableau suivant :

température d'incubation	35°	37°	40°
3e jour	0	2 U.H	2 U.H
4e jour	1 U.H	4 U.H	4 U.H
5e jour	2 U.H	4 U.H	4 U.H
6e jour	4 U.H	8 U.H	4 U.H

La température optima d'incubation est donc 37°, mais l'hémagglutinine apparaît également à 35° et à 40° ; à 35°, l'effet cytopathogène est très ralenti ; au 6e jour la culture est encore bien fixée à la paroi du tube et seulement partiellement détruite. Il se pourrait qu'une observation plus prolongée nous fournisse autant d'hémagglutinine qu'à 37° mais plus tardivement, nous ne l'avons pas vérifié.

4e facteur : le jour optimum de récolte de l'hémagglutinine

Cette nouvelle expérience fut réalisée sur une boîte de Roux de cellules rénales de Singe de primo-explantation inoculée avec environ 2 000 à 5 000 U.F.P.

Des échantillons du surnageant sont prélevés chaque jour et conservés à -30°. Leur pouvoir hémagglutinant est titré en un seul temps ;

comme d'habitude, 48 heures après l'inoculation, le milieu avait été renouvelé.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

	2e j	3e j	4e j	5e j	7e j	8e j	9e j
titre pour 0,2ml	2 U.H	16	32	32	16	16	16

C'est après avoir étudié cette courbe de production de l'hémagglutinine ourlienne que nous avons essayé de faire une première récolte du surnageant au 4e jour date à laquelle le titre atteint son maximum, puis en renouvelant le milieu de survie d'obtenir une seconde récolte ; cette technique nous a permis d'augmenter le rendement de notre production d'hémagglutinine.

III - Conservation de l'hémagglutinine ourlienne

Nous avons vérifié la bonne conservation de cette hémagglutinine ourlienne au froid. Un lot de cet antigène fut partagé en deux échantillons, l'un placé à +4°, l'autre congelé à -30° et des titrages furent pratiqués tous les mois pendant 8 mois.

Aucune baisse de titre ne fut observée tant à +4° qu'à -30° et ce malgré l'alcalinisation des échantillons conservés à +4° et malgré les décongélations et recongélations successives auxquelles fut soumis l'échantillon conservé à -30°.

L'hémagglutinine ourlienne est donc parfaitement stable au froid et facile à conserver.

IV - Traitement de l'hémagglutinine ourlienne par le mélange tween 80 et éther

L'étude de la nature des hémagglutinines des myxovirus a montré leur sensibilité à l'éther et à la trypsine et démontré de ce fait leur nature lipoprotéique. L'éther solvant des lipides attaque l'enveloppe virale et entraîne la perte du pouvoir infectant et du pouvoir hémagglutinant.

En 1962 NORRBY a montré, à propos du virus de la rougeole, que l'addition d'une petite quantité de tween 80 à la suspension virale avant le traitement à l'éther modifie son action et fait monter le titre hémagglutinant d'une préparation dans des proportions parfois très importantes. Les particules virales ainsi dégradées libèrent une hémagglutinine plus petite.

Plusieurs auteurs ont vérifié ces faits dans le cas du virus ourlien et rapportent une baisse du titre hémagglutinant sous l'action de l'éther, son élévation sous l'action du mélange tween 80-éther. Nous avons adopté la technique de NORRBY pour augmenter le titre hémagglutinant de nos préparations et nous nous permettons de rappeler le détail de ses modalités.

A 50 ml d'une préparation hémagglutinante refroidie au préalable en la plaçant 15 minutes à +4° nous ajoutons 0,125 p.cent soit une goutte de tween 80. Après avoir bien agité pendant deux minutes à la température du laboratoire, un volume d'éther anesthésique égal à

la moitié du volume initial, soit 25 ml est ajouté. Le tout bien mélangé est placé à +4° pendant 10 minutes et agité à plusieurs reprises, puis centrifugé pendant 20 minutes à 3 000 tours/mn. Le gel superficiel de tween éther est rejeté ou plus simplement transpercé par une pipette pour recueillir la phase aqueuse après barbottage d'azote pour éliminer l'éther résiduel.

L'hémagglutinine fragmentée de titre élevé doit être conservée à +4°.

Nous avons obtenu les montées de titre suivantes :

	titre hémagglutinant avant traitement	titre après traitement au tween-éther
hémagglutinine recueillie le 4e jour	16 unités H.A	256 U. H.A

Comme le signale NORRBY, cette hémagglutinine fragmentée requiert une plus petite quantité d'anticorps pour être inhibée si bien que son emploi sensibilise la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Cependant dans sa préparation la concentration de Tween 80 employée doit être précise, une quantité trop importante, si elle augmente bien le titre hémagglutinant, peut faire apparaître une activité hémolytique et l'hémagglutinine ne peut plus convenir pour la sérologie en inhibition de l'hémagglutination.

Bien que nous ayons respecté ces impératifs, l'hémagglutinine de titre élevé obtenue après traitement de nos surnageants par le tween-ether, n'était plus inhibée par les sérums de convalescents d'oreillons. Dans les travaux qui suivent, nous avons donc toujours employé une hémgglutinine brute, n'ayant pas subi ce traitement en attendant d'éclaircir les raisons de cet échec.

-:-

CHAPITRE VI

-:-

LA REACTION D'HEMAGGLUTINATION

-:-

Technique de la réaction d'hémagglutination

L'activité hémagglutinante du surnageant des cultures cellulaires (inoculées avec le virus ourlien) recueilli dans les conditions indiquées précédemment est facile à mettre en évidence ; nous utilisons des hématies de singe rhésus (ces hématies sont fournies par l'Institut Pasteur) lavées 3 fois dans l'eau physiologique, puis mises en suspension à 0,5 p.cent dans le même soluté.

Cette réaction effectuée dans une plaque à godets permet le titrage de l'hémagglutinine ourlienne. Dans les deux premiers godets on distribue 0,2 ml de surnageant pur, dans le 2e godet et dans les six godets suivants 0,2 ml d'eau physiologique. A partir du 2e godet, on fait une dilution de 2 en 2 jusqu'au septième godet dilué au 1/64e dont on rejette 0,2 ml. Dans le 8e godet (témoin globules rouges) on dépose 0,2 ml d'eau physiologique.

Puis dans chaque godet, on ajoute 0,2 ml de la suspension globulaire à 0,5 p.cent. Après agitation, on abandonne la plaque, après l'avoir couverte, pendant 1 heure, à la température du laboratoire.

Dans les premiers godets les hématies agglutinées forment un réseau aux bords crénelés occupant tout le fond de la cupule ; par définition, la dernière dilution montrant une hémagglutination complète contient une unité hémagglutinante. Aux dilutions supérieures les globules sédimentent, formant au fond du godet une petite pastille ronde, dense, à bords nets.

Le témoin globules vérifie le bon état de ces hématies, leur absence d'agglutination spontanée, leur capacité de sédimentation normale. Les modalités de cette technique d'hémagglutination furent définitivement choisies après avoir étudié les principaux éléments variables de cette réaction.

1) La température d'incubation optima pour la réaction d'hémagglutination

Un même lot d'hémagglutinine fut titré selon la méthode décrite mais en faisant varier uniquement la température d'incubation.

Trois plaques identiques sont donc préparées et placées respectivement à +4°, à température du laboratoire soit 20° et à 37°.

Après une heure d'incubation, le même titre hémagglutinant est lisible aux trois différentes températures ; cependant le réseau d'hématies agglutinées est moins net, moins fin à 37°.

2) L'espèce animale fournissant les globules rouges

Nous avons comparé le titre hémagglutinant d'un même lot d'hémagglutinine pour des hématies de diverses espèces. Voici les titres obtenus :

Singe Rhésus	Babouin	Poulet	Cobaye	Pigeon	Homme (groupe sanguin O)
16 U.H/ 0,2ml	8 U.H./ 0,2ml	8.U.H/ 0,2ml	8 U.H/ 0,2ml	0	0

Des essais répétés nous ont donné des résultats toujours du même ordre. C'est à leur suite que nous avons constamment employé des globules de singe rhésus pour nos réactions d'hémagglutination ourlienne, bien que cette notion ne soit pas classique à notre connaissance. L'agglutination des hématies de rhésus par le virus ourlien n'avait pas été décrite à ce jour et la possibilité de disposer de globules ayant de bons récepteurs semblait une des difficultés majeures de la standardisation de ces techniques.

CANTELL et PENTTINEN ont montré que l'absence d'agglutination des globules rouges humains n'était pas un caractère du virus ourlien mais qu'elle était due à des inhibiteurs présents dans la préparation d'hémagglutinine ; par plusieurs moyens ils ont pu retirer ces inhibiteurs et les globules humains devenaient alors agglutinables.

3) Les solutés employés pour la dilution de l'hémagglutinine, pour le lavage des hématies et leur mise en suspension :

Nous avons comparé les résultats obtenus en utilisant soit le sérum physiologique, soit le tampon phosphaté P.B.S. pour la dilution de l'hémagglutinine. Nous avons obtenu les mêmes titres dans les deux cas, mais c'est dans le sérum physiologique que la lecture du titre est la plus nette, que l'hémagglutination

est la plus belle.

Nous avons également lavé les globules soit dans le sérum physiologique, soit dans le tampon D.G.V. avec des résultats absolument équivalents. Il nous a paru souhaitable de choisir le plus simple et nous utilisons donc le sérum physiologique pour tous les temps de la technique.

-:-

CHAPITRE VII

-:-

LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

-:-

I - Principe de la réaction

Les travaux de HIRST ont permis la mise au point de cette technique sérologique ; en effet, en récoltant des liquides amniotiques et allantoïques d'oeufs de poule embryonnés inoculés avec le virus grippal, il constata l'agglutination des hématies libérées lors de la blessure d'un vaisseau de l'embryon (alors que ces globules n'étaient pas agglutinés par des liquides analogues provenant d'oeufs témoins non inoculés).

Le virus grippal possédait donc un antigène hémagglutinant ou hémagglutinine actif sur les hématies de poulet.

HIRST montra que les sérums de malades convalescents de grippe inhibaient spécifiquement cette hémagglutination et qu'il était possible de titrer les anticorps correspondants.

La réaction de Hirst ou réaction d'inhibition de l'hémagglutination fut ensuite appliquée au diagnostic de nombreuses infections dues à des virus producteurs d'hémagglutinines et notamment aux infections ourliennes.

Dans le sérum des malades infectés par un virus hémagglutinant apparaissent en quelques jours des anticorps spécifiques qui mis en présence de l'hémagglutinine correspondante in vitro vont former un complexe antigène-anticorps; les sites hémagglutinants viraux sont ainsi bloqués et après addition d'une suspension d'hématies sensibles possédant les récepteurs de l'hémagglutinine, l'hémagglutination ne pourra plus se produire.

L'inhibition de l'hémagglutination témoigne donc de la présence d'anticorps, les globules sédimentent alors en un culot dense, arrondi à bord net ; au contraire, en l'absence d'anticorps spécifiques les hématies sont agglutinées et forment un fin réseau aux limites irrégulières. Le titrage de ces anticorps est réalisable en mettant en présence une quantité constante déterminée d'hémagglutinine et des dilutions progressivement croissantes des sérums à examiner. Après avoir ajouté la suspension de globules rouges sensibles, et après un temps de sédimentation, la lecture à l'oeil nu détermine la plus haute dilution du sérum entraînant une inhibition totale de l'hémagglutination, c'est-à-dire le titre du sérum.

II - Technique du séro diagnostic ourlien par inhibition de l'hémagglutination

1) Les réactifs

. Après titrage, l'hémagglutinine ourlienne produite au laboratoire dans les conditions que nous avons vues précédemment est diluée dans l'eau physiologique de telle sorte que 4 unités hémagglutinantes soient contenues dans un volume de 0,2ml.

. Les hématies de Singe rhésus recueillies

et conservées dans un volume égal de solution d'Alsever à +4° (fournies par l'Institut Pasteur) sont lavées trois fois dans l'eau physiologique. Le culot de centrifugation obtenu est mis en suspension dans cette même solution aux concentrations que nous indiquerons.

2) Le traitement des sérums

Les sérums à examiner sont décantés à partir des prélèvements sanguins coagulés. Ils sont conservés à +4° ; il est en effet préférable de titrer simultanément et comparativement pour chaque malade, un sérum précoce prélevé au tout début de la maladie et un second sérum prélevé 8 à 10 jours plus tard afin de montrer une éventuelle ascension du titre des anticorps ourliens. Ils peuvent également être conservés plusieurs mois à -30°.

Les sérums sont préalablement décomplémentés par chauffage à 56° pendant 30 minutes dans un bain marie.

Le traitement proprement dit a pour but d'éliminer les iso-agglutinines anti Rhésus contenues dans les sérums. Pour cela, à 0,25 ml de chacun des sérums on ajoute 1 ml d'une suspension d'hématies de singe rhésus à 10 p.cent dans l'eau physiologique. Après agitation, le mélange est laissé à +4° pendant une heure, mais ce temps d'adsorption peut être prolongé sans inconvénient une nuit.

Les globules adsorbent les agglutinines spontanées et le surnageant recueilli le lendemain correspond au sérum dilué au 1/5e, prêt à être engagé dans la réaction.

3) La réaction proprement dite

La réaction est effectuée dans des plaques en acrylic creusées de 80 cavités à fond hémis-

phérique de 16 mm de diamètre. Ces plaques doivent être lavées très soigneusement, rincées à l'eau distillée et séchées à l'abri de toute poussière.

Tous les éléments de la réaction sont utilisés sous volume de 0,2 ml. Chaque sérum au 1/5e est dilué dans 10 godets, suivant une progression géométrique de raison deux, dans l'eau physiologique, ce qui constitue une gamme de dilutions allant du 1/5e au 1/2560e.

Après addition dans chaque godet de 4 unités hémagglutinantes sous volume de 0,2 ml et agitation, la plaque est laissée en incubation à 37° pendant une heure.

On ajoute ensuite dans chaque godet 0,2 ml d'une suspension de globules rouges de singe rhésus à 0,5 p.cent dans l'eau physiologique. Les plaques bien couvertes sont laissées sur la paillasse du laboratoire.

Après une heure de contact, la lecture des résultats est possible. Pour chaque sérum le titre des anticorps ourliens est donné par la plus forte dilution inhibant totalement l'hémagglutination. Si l'hémagglutination se produit pour toutes les dilutions, le titre est inférieur au 1/5e et le sérum considéré comme négatif.

Systématiquement pour chaque sérum un témoin est réalisé en remplaçant l'antigène par 0,2 ml d'eau ϕ afin de vérifier l'élimination de toutes les agglutinines naturelles anti-rhésus. Dans ce godet contenant 0,2 ml de sérum traité, 0,2 ml d'eau ϕ et 0,2 ml de la suspension d'hématies, on observe une sédimentation en un culot rond à bords nets.

D'autre part, il est souhaitable d'incorporer

dans chaque série de dosages un sérum positif de référence provenant d'un sujet antérieurement immunisé, ce qui permet de comparer des examens pratiqués à des dates différentes.

Un contrôle de l'hémagglutinine doit aussi être systématiquement pratiqué. Dans 4 godets contenant respectivement 0,2 ml de la suspension antigénique utilisée dans la réaction puis sa dilution au 1/2, au 1/4 et au 1/8e dans l'eau physiologique on ajoute 0,2 ml d'eau ϕ qui remplace le sérum. Après l'addition des globules sensibles, on doit observer une hémagglutination dans les trois premiers godets seulement qui contiennent 4, 2 et 1 unité hémagglutinante alors que le 4e godet doit montrer une simple sédimentation.

Enfin un témoin globules (0,4 ml d'eau ϕ + 0,2 ml de suspension globulaire) confirme le bon état des hématies en montrant une parfaite sédimentation.

Les différents éléments sont donc répartis selon les tableaux suivants :

	témoin sérum	sérum testé										
Numéro des godets		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Sérum traité (dilué au 1/5)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 rejeté
Eau physiologique	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Dilution du sérum		1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1080	1/2160	
Hémagglutinine (4 U.Hém.)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Laisser en contact 1 heure à 37°												
Hématies de Rhésus à 0,5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	

Laisser en contact 1 heure à la température du laboratoire

	témoin globules	témoin hémagglutinine				
Numéro des godets		1	2	3	4	
Hémagglutinine 4 U. Hém.		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 rejeté
Eau physiologique			0,2	0,2	0,2	
Eau physiologique	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	
Hématies à 0,5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	

Le dosage des anticorps ourliens par inhibition de l'hémagglutination peut aussi être réalisé en microméthode qui nécessite des quantités réduites d'hémagglutinine et des quantités minimes de sérum.

Le processus est identique ; les sérums décomplémentés sont adsorbés sous volume de 0,05 ml en présence de 0,2 ml d'une suspension de globules à 10 p.cent. Le dosage est réalisé à l'aide de plaques plastiques à usage unique formées de godets à fond conique. Les réactifs sont répartis à l'aide d'un compte-gouttes spécial sous volume de 0,05 ml et le sérum dilué à l'autopipette. La suspension d'hématies est utilisée à la concentration de 0,3 p.cent.

Cette technique de réaction d'inhibition de l'hémagglutination est simple à réaliser, elle donne des résultats facilement interprétables dans de bonnes conditions de sensibilité et de spécificité.

Dans ces conditions, nous avons pratiqué le dosage des anticorps ourliens sur deux sérums (précoce et tardif) de l'enfant chez lequel nous avons isolé notre souche de virus ourlien productrice d'hémagglutinine. Leurs titres étaient respectivement :

1/2 et 1/64e en séroneutralisation
1/40e et $>$ 1/2560e en inhibition de l'hémagglutination

Cependant, il se peut que certains sérums contiennent des inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination qui bien que présents à un faible titre, pourraient entraîner des résultats faussement positifs; ils peuvent être éliminés par différents procédés de traitement préalable des sérums. Nous n'avons expérimenté

pour l'instant que l'un d'entre eux, l'adsorption par le kaolin.

III - Adsorption par le kaolin des inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination présents dans les sérums

Nous avons utilisé la technique de ROSEN décrite pour la sérologie de la rougeole ; nous avons dû y apporter de légères modifications.

Le kaolin (kaolin acid-washed Hopkins Williams) après lavage dans un tampon phosphate jusqu'à ce que son pH atteigne la valeur de 7,2 est mis en suspension à 25 p.cent dans un nouveau tampon Dextrose-Gélatine-Véronal ; cette suspension est mélangée à volume égal avec le sérum à traiter décomplémenté et dilué au 1/5 dans ce même tampon D.G.V. Le temps de contact est de 20 minutes à température du laboratoire. Puis après 10 minutes de centrifugation, le surnageant est recueilli, il représente le sérum au 1/10e privé de ses inhibiteurs spécifiques.

Il est alors débarrassé de ses agglutinines naturelles anti-rhésus : à 1 ml de sérum traité par le kaolin on ajoute 0,1 ml d'une suspension à 50 p.cent d'hématies de singe rhésus ; le contact est maintenu au moins une heure à +4°, il peut être prolongé la nuit sans inconvénient. Après centrifugation, le surnageant est prêt à l'emploi.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination se fait alors selon la technique décrite plus haut, les dilutions sériques étant pratiquées indifféremment dans le tampon D.G.V. ou dans l'eau physiologique.

Dans cette technique une condition nous a paru indispensable c'est d'utiliser le tampon D.G.V. comme diluant du kaolin ; différets essais préalables qui ne respectaient pas cette donnée se sont toujours soldés par la disparition de toute activité inhibante des sérums tant spécifique que non spécifique.

Afin d'apprécier la valeur de l'adsorption des inhibiteurs non spécifiques par le kaolin, nous avons titré 22 paires de sérums et notre sérum de référence comparativement selon trois techniques :

- par neutralisation de l'effet cytopathogène
- par inhibition de l'hémagglutination sans traitement préalable des sérums au kaolin
- par inhibition de l'hémagglutination après traitement des sérums au kaolin.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

Six paires de sérums pour lesquelles nous avons constaté l'absence d'anticorps ourliens spécifiques en neutralisation (titre $<$ 1/2) et une inhibition de l'hémagglutination au 1/10e quand le sérum n'était pas traité ont vu disparaître cette inhibition après traitement du sérum au kaolin.

Trois paires de sérums de sujets ayant des antécédents éloignés d'oreillons présentaient des anticorps neutralisants et inhibant l'hémagglutination à un titre stable. Après traitement au kaolin, ils ont vu leur titre inhibant d'hémagglutination baisser de un ou deux godets ; mais même quand ce titre était faible, la présence des anticorps et leur état d'immunité était décelés.

Treize paires de sérums provenaient de con-

valescents d'infections ourliennes et présentaient une ascension des anticorps, tant en séroneutralisation qu'en inhibition de l'hémagglutination. L'adsorption des sérums par le kaolin entraîna très régulièrement une baisse de titre de 2 ou 3 godets en moyenne, en conservant, bien entendu, l'ascension des anticorps entre les deux sérums.

Il n'est donc pas indispensable de traiter les sérums au kaolin lorsqu'on travaille sur une paire de sérums avec laquelle on se propose de porter le diagnostic d'infection ourlienne récente. Par contre, si la réaction d'inhibition de l'hémagglutination est utilisée pour juger de l'état d'immunité anti-ourlienne d'un individu, l'extraction des inhibiteurs non spécifiques s'avère indispensable puisque un titre au 1/10 va souvent de pair avec une absence d'anticorps neutralisants. Il est cependant probable que le kaolin retire des sérums une quantité importante d'anticorps spécifiques ; les fortes baisses de titre constatées sur les sérums des convalescents après traitement au kaolin sont en faveur de cette interprétation.

C'est pourquoi nous vous proposons dans un temps ultérieur d'expérimenter la technique de MANN et coll.; ces auteurs retirent les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination des réovirus par traitement des sérums au chlorure de manganèse et à l'héparine. Cette technique a été appliquée avec succès à l'extraction des inhibiteurs non spécifiques de la rougeole et de la rubéole. Rappelons qu'elle n'est à considérer que si les inhibiteurs à éliminer sont associés aux β lipoprotéines des sérums.

Numéros de référence des sérums	Neutralisation		Inhibition de l'hémagglutination			
			Sérums non traités au kaolin		Sérums traités au kaolin	
	Précoce	Tardif	Précoce	Tardif	Précoce	Tardif
68 0334	< 1/2	< 1/2	1/10	< 1/10	< 1/10	< 1/10
68 0430	< 1/2	< 1/2	1/10	1/10	< 1/10	< 1/10
68 0481	< 1/2	< 1/2	1/10	1/10	< 1/10	< 1/10
68 0493	< 1/2	< 1/2	1/10	1/10	< 1/10	< L/10
68 0508	< 1/2	< 1/2	1/10	1/10	épuisé	< 1/10
68 0522	< 1/2	< 1/2	1/10	1/10	< 1/10	< 1/10
68 0245	1/2	1/2	1/40	1/40	1/10	1/10
68 0429	1/64	1/64	1/80	1/80	1/40	1/40
68 0506	1/8	1/8	1/80	1/80	1/20	1/20
Témoin référence	1/16		1/40		1/20	

67 1387	< 1/2	1/64	1/5	1/640	< 1/10	1/160
68 0002	< 1/2	1/64	1/40	⩾ 1/2560	1/10	1/640
68 0004	< 1/2	1/32	1/5	1/160	< 1/10	1/80
68 0005	< 1/2	1/64	1/5	1/160	< 1/10	1/160
68 0006	1/32	1/128	1/160	1/640	1/40	1/160
68 0064	1/8	1/128	1/80	1/640	1/20	1/160
68 0073	< 1/2	1/64	1/40	1/160	< 1/10	1/40
68 0109	1/16	1/64	1/320	1/1280	1/80	1/320
68 0132	1/32	1/256	1/320	1/1280	1/40	1/320
68 0133	< 1/2	1/32	1/20	1/320	< 1/10	1/80
68 0135	< 1/2	>1/256	1/160	> 1/2560	< 1/10	1/80
68 0157	1/4	1/256	1/40	1/320	1/20	1/160
68 0201	1/64	>1/256	1/320	> 1/2560	1/40	1/160

IV - Spécificité de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le diagnostic d'une infection ourlienne

Dans un premier temps nous avons vérifié par titrage des anticorps inhibant l'hémagglutination sur des paires de sérums prises au hasard qu'une ascension d'anticorps ourliens ne s'accompagne en aucun cas d'une montée des anticorps de la rougeole ou de la rubéole ou vice versa. Nous n'avons observé aucun phénomène de rappel, comme l'indique le tableau ci-après.

Dans un deuxième temps nous avons préparé sur cellules B.S.C. de l'hémagglutinine du virus de la maladie de Newcastle ; nous avons mis en évidence son pouvoir hémagglutinant pour les hématies de singe rhésus. Notre sérum de référence qui inhibe au 1/40e l'hémagglutinine ourlienne ne possède aucun pouvoir inhibiteur pour cette hémagglutinine.

L'hémagglutinine du virus N.D.V. qui ne contamine qu'exceptionnellement l'homme pourrait être utilisée comme l'est l'hémagglutinine du virus Sindbis pour contrôler l'absence d'inhibiteurs non spécifiques dans les sérums.

Afin d'apprécier la spécificité de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le sérodiagnostic des infections ourliennes il serait enfin indispensable de disposer d'antigènes hémagglutinants des quatre types de virus parainfluenzae et de comparer l'évolution du taux des anticorps inhibant ces différentes hémagglutinines dans les mêmes paires de sérums.

Numéro des dossiers	Séro diagnostic des oreillons (IHA)		Séro diagnostic de la rougeole (IHA)		Séro diagnostic de la rubéole (IHA)	
67 1387	5	640	160	160	< 8	< 8
68 35	80	80	160	320	128	128
68 52	< 5	< 5	10	160	< 8	< 8
68 70	< 5	< 5	40	épuisé	< 8	< 8
68 71	< 5	< 5	80	80	< 8	< 8
68 77	< 5	< 5	5	5	< 8	< 8
68 79	40	40	20	épuisé	1024	1024
68 80	40	40	80	640	< 8	< 8
68 82	< 5	< 5	épuisé	1 280	< 8	< 8
68 86	< 5	< 5	5	5	< 8	< 8
68 113	< 5	< 5	80	épuisé	2048	2048
68 118	< 5	< 5	320	320	512	512
68 121	< 5	< 5	40	640	> 4096	> 4096
68 127	< 5	< 5	5	2560	8	8

N° des dossiers	Séro diagnostic des oreillons (IHA)		Séro diagnostic de la rougeole (IHA)		Séro-diagnostic de la rubéole (IHA)	
68 131	< 5	< 5	< 5	< 5	< 8	< 8
68 139	40	40	40	640	< 8	< 8
68 147	< 5	< 5	640	640	< 8	< 8
68 156	10	10	20	320	1024	1024
68 160	40	40	80	80	1024	1024
68 191	< 5	< 5	40	640	< 8	< 8
68 208	< 5	< 5	5	640	> 4096	> 4096
68 334	10	10	1280	> 2560	128	128
68 347	80	320	< 5	< 5	< 8	< 8

CHAPITRE VIII

-:-

DISCUSSION

-:-

I. Comparaison des 3 techniques de séro-diagnostic ourlien utilisées :

Dans le but de comparer la valeur des différents tests sérologiques utilisables pour le diagnostic indirect des oreillons - séroneutralisation, fixation du complément, inhibition de l'hémagglutination - nous avons titré parallèlement plusieurs sérums à l'aide de 2 ou 3 de ces techniques. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination a été pratiquée sans traitement préalable des sérums au kaolin ; ils conservaient donc leurs éventuels inhibiteurs non spécifiques.

Les résultats obtenus sont confrontés dans le tableau suivant :

Numéro des dossiers	Sérodiagnostic des oreillons					
	Inhibition de l'hémagglutination		Séro-neutralisation		Fixation du complément	
	ler sérum	2e sérum	ler sérum	2e sérum	ler sérum	2e sérum
67-1313		160		64		
67-1387	5	640	< 2	épuisé		
68-2	40	> 2560	< 2	64		
68-3	320	320	> 256	> 256		
68-4	5	160	< 2	32	< 10	> 160
68-5	5	160	< 2	64	< 10	80
68-6	160	640	32	128	40	> 160
68-37	160	160	32	32		
68-64	80	640	8	128	40	160
68-73	40	160	< 2	64		
68-105	640	640	32	32		
68-109	320	1280	16	64	> 160	> 160
68-132	320	1280	32	256	80	> 160
68-133	20	320	< 2	32		
68-135	160	> 2560	< 2	> 256	80	> 160
68-138	160		16			
68-157	40	320	4	256		

68.201	320	> 2560	64	> 256	80	> 160
68.193	320	320	256	256		
68.202	80	640	8	64		
68.233	40	160	4	32	80	> 160
68.241	160	> 2560	4	128		
68.242	320		64			
68.245	40	40	2	2		
68.284	20	320	< 2	32	40	> 160
68.302	< 5		< 2			
68.304	40	320	< 2	32	40	> 160
68.334	10	10	< 2	< 2		
68.346	épuisé	160	< 4	16		
68.347	80	320	< 16	64		
68.430	10	10	< 2	< 2		
68.481	10	10	< 2	< 2		
68.493	10	10	< 2	< 2		
68.505	20	1280	4	64		
68.506	80	80	8	8		
68.508	10	10	< 2	< 2		
68.522	10	10	< 2	< 2		
68.523	160	640	8	32	40	> 160
68.525	640	640	32	32		
68.526	10	320	< 2	16	< 10	160

Numéro des dossiers	Inhibition de l'hémagglutination		Séro-neutralisation		Fixation du complément	
	1er sérum	2e sérum	1er sérum	2e sérum	1er sérum	2e sérum
68.542	10	80	< 2	32		
68.544	20	320	< 2	16		
68.596	40	640	4	128	< 10	160
68.625	40	640			20	> 160
68.662	10	80	< 2	16		
68.690	10	1280	< 2	64	20	> 160
68.711	5	160			< 10	> 160
68.749	20	160			20	> 160
68.755	10	320			80	> 160
68.797	< 5	80			20	> 160
68.839	40	1280			80	> 160
68.853	40	2560			80	> 160
68.886	40	160			80	> 160
68.1189	20	40			40	160
68.1202	5	40			< 10	> 160
68.1221	80	1280			> 160	> 160
68.1268	20	320			80	> 160
68.1312	10	40			10	> 160
68.1328	10	80			> 160	> 160
68.1413	40	640			40	> 160

68.1432	10	160			< 10	160
68.1510	80	640			160	> 160
68.1634	40	160			80	160
68.1652	10	320			20	160
68.1681	< 5	320			< 10	> 160
68.1693	20	160			< 10	160
68.1745	40	160			40	40
68.1753	80	320			40	80
68.1758	< 10	320			< 10	40
68.1775	20	320			< 10	160

Voyons quelles sont les caractéristiques de ces trois réactions et leur intérêt respectif :

La réaction de fixation du complément effectuée avec l'antigène ourlien de l'Institut Pasteur n'a jamais été mise en défaut. Cependant elle présente certains inconvénients qui tiennent à sa technique même.

Elle fait intervenir 5 variables (alors qu'il n'y en a que 3 pour la réaction d'IHA). Elle nécessite un système hémolytique (hématies de mouton - sérum antihématies de mouton) bien équilibré et un dosage précis du complément qui en raison de la grande thermolabilité de ce dernier doit être renouvelé à chaque série. Sa réalisation en microméthode qui permettrait de réduire la consommation d'antigène est plus delicate que celle de la réaction d'IHA. Enfin elle necessite un délai d'environ 24 heures (dont une nuit de contact antigène-sérum-complément).

Des réactions non spécifiques peuvent se rencontrer avec l'antigène ourlien ; elles imposent un contrôle sur les faibles dilutions du sérum à examiner à l'aide d'un antigène témoin préparé selon le même procédé que l'antigène spécifique mais à partir d'oeufs non inoculés.

Nous avons vu d'autre part que pour chaque sérum, on doit pratiquer un contrôle afin de dépister une eventuelle activité anticomplémentaire.

Tous ces témoins compliquent donc la réaction par contre la lecture du titre est simple et précise en prenant l'hémolyse totale comme critère.

Dans nos résultats nous voyons que les

titres obtenus grâce à cette réaction de fixation du complément diffèrent peu de ceux obtenus par inhibition de l'hémagglutination.

Dans un cas cependant (N° 68.1328), à une ascension du titre IHA correspond un titre constant au 1/160e dans les 2 sérums.

Dans un autre cas (N° 68.1745) à une montée de titre IHA de 2 godets correspond le même titre relativement faible de 1/40e.

Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à l'antériorité d'apparition de certains anticorps par rapport aux autres.

Les anticorps ourliens fixant le complément apparaissent entre le 5e et le 7e jour d'évolution de la maladie, présents dans tous les cas à la 2e ou à la 3e semaine, où ils atteignent le titre maximum de 1/160e ou 1/320e, ils peuvent, après un déclin rapide persister au faible taux de 1/10e pendant des années.

L'expérience a conduit à utiliser le sérum dilué au 1/10 comme dilution initiale en raison de réactions non spécifiques. Les faibles titres sont donc difficilement interpretables, ils ne permettent pas de différencier un sujet réceptif d'un sujet ayant des séquelles d'infections anciennes dües au virus ourlien ou à des virus apparentés (parainfluenzae, virus de la maladie de Newcastle). Seule une montée de titre d'au moins deux dilutions entre un sérum precoce et un sérum tardif permet donc d'affirmer l'etiologie ourlienne des syndrômes observés. A défaut de sérum precoce cependant, le seuil de positivite a été fixé au 1/80e.

L'intérêt de la réaction de fixation du complément et donc limité, elle n'est utilisée ni dans les enquêtes épidémiologiques, ni dans

les études récentes de vaccination antiourlienne.

La réaction d'inhibition de l'hemagglutination est la technique la plus facile à réaliser. L'hemagglutinine ourlienne, comme nous l'avons vu, peut être produite en grande quantité sur les cultures cellulaires ; stable, elle conserve le même titre pendant plusieurs mois à + 4° ou à - 20° et son activité sur les globules rouges de singe rhésus sera donc contrôlée par un simple témoin inclus dans la réaction.

La réaction est parfaitement reproductible, les resultats obtenus par la macrométhode et par la microméthode sont identiques. Elle est rapide, pouvant être effectuée en quelques heures, y compris le temps de preparation des sérums et facilement réalisable en série.

Elle est spécifique et sensible : lorsque les sérums sont débarrassés de leurs seules agglutinines naturelles anti-rhésus, nous obtenons parfois des titres $> 1/2560$ et un titre moyen de 1/763 pour les sérums tardifs dans les cas ou une montee d'anticorps a été demontree. Ce simple traitement suffit lorsqu'il s'agit de poser le diagnostic d'infection ourlienne, par contre, comme pour la réaction de fixation du complément, s'il faut juger l'état de réceptivité ou d'immunité d'un individu il devient insuffisant ; il faut alors recourir en outre au traitement des sérums par le kaolin qui retire les inhibiteurs non spécifiques ; ce traitement entraîne en même temps une baisse du taux des anticorps spécifiques et diminue donc la sensibilité de la réaction. Enfin il semble qu'un titre IHA $< 1/5$ puisse être observé chez un sujet immun ; c'est ce qu'indiquent Buynak et Hilleman à la suite de leurs travaux portant sur le

vaccin atténué contre les oreillons, effectués sur une grande échelle et auxquels on peut accorder une valeur statistique ; c'est dans ces rares cas (enquêtes épidemiologiques, études de vaccin) que la réaction de séroneutralisation s'avérerait indispensable.

La réaction de séroneutralisation ne peut être entreprise que dans un laboratoire de virologie ; elle exige en effet des cultures cellulaires en parfait état, une souche de virus ourlien bien adaptée au type de cellules utilisé et dont le titre infectant est vérifié avant chaque titrage.

C'est une technique delicate qui doit être effectuée aseptiquement ; c'est surtout une technique longue à réaliser dont les différentes étapes s'etalent sur près d'une semaine puisque la lecture de l'effet cytopathogène ne peut avoir lieu que 3 jours après l'inoculation des tubes de culture cellulaire.

En cas d'infection ourlienne les anticorps neutralisants apparaissent au 5e jour de la maladie ; après une ascension rapide, ils se stabilisent à un niveau relativement faible : le taux moyen des sérums tardifs positifs que nous avons dosés est de 1/115e.

Plusieurs auteurs, à la suite d'études comparatives, ont indiqué que les courbes evolutives des anticorps neutralisants et inhibant l'hémagglutination en fonction du temps, chez des malades présentant des infections ourliennes, étaient superposables.

Cependant, le grand avantage de la réaction de séroneutralisation c'est de permettre de differencier un sujet receptif d'un sujet immun ayant des antécédents éloignés d'oreillons; en effet, un taux d'anticorps neutralisants inférieur à 1/2 est toujours retrouvé chez les

individus réceptifs, alors qu'un taux significatif supérieur ou égal à 1/2 semble persister toute la vie chez les individus ayant présenté une infection ourlienne naturelle.

En conclusion, la réaction d'inhibition devrait donc remplacer avantageusement la réaction de fixation du complément dans le diagnostic des infections ourliennes. Pratiquée dans de bonnes conditions techniques (les sérums étant traités préalablement au kaolin) elle rendrait même inutile dans la plupart des cas la réaction de séro-neutralisation qui en raison de sa complexité serait réservée aux cas pour lesquels se pose le problème de l'existence d'un état d'immunité.

-:-

II - Application de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination au diagnostic des infections ourliennes

Nous avons pratiqué extensivement le séro-diagnostic ourlien en inhibition de l'hémagglutination pendant deux ans à l'Hôpital Claude Bernard ; au cours de cette expérience nous avons eu l'occasion d'observer quelques cas intéressants.

Diagnostic d'une parotidite atypique -

Mademoiselle C... Thérèse, infirmière en O.R.L.; âgée de 26 ans, hospitalisée dans le service du Professeur MOLLARET présentait à son admission un syndrome fébrile, des douleurs auriculaires droites ainsi qu'une volumineuse tuméfaction qui débordait largement la loge parotidienne droite, un important oedème s'étendant de la fosse temporale au creux sus-sternal ; l'orifice du canal de Stenon était congestif mais il était impossible de faire sourdre la salive par massage de la parotide. Le lendemain, une dysphonie apparaissait et l'examen du larynx montrait un oedème de l'arythénoïde droit.

Le diagnostic de phlegmon parotidien pouvait donc être envisagé.

Cependant, l'absence d'antécédent ourlien connu, les résultats de la numération formule sanguine (neutropénie à 4 100) et le dosage de l'amylasémie à 163 unités (amylasémie normale : 40 à 100 U) s'opposaient à ce diagnostic.

Sous traitement antibiotique, (pénicilline et streptomycine) et corticothérapie, la tuméfaction régressa, la peau conservant un aspect normal.

Le séro diagnostic ourlien par inhibition de l'hémagglutination permit de poser le diagnostic de parotidite ourlienne en montrant une ascension du titre des anticorps spécifiques du 1/20e au 1/1280e entre deux sérums prélevés à 10 jours d'intervalle. Pendant ce temps d'ailleurs, des douleurs et une discrète tuméfaction parotidienne gauche étaient apparus.

Diagnostic des méningites et des méningo-encéphalites ourliennes -

La pratique systématique de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination chez des malades présentant des méningites lymphocytaires aiguës ou des méningo-encéphalites, en l'absence de tout signe d'atteinte des glandes salivaires, nous a permis d'affirmer l'étiologie ourlienne de quelques uns de ces cas.

Ainsi, Monsieur T... Marcel, 37 ans, hospitalisé dans le service du Professeur DOMART présentait un syndrome méningé clinique ; aucun autre symptôme (éruption, angine, parotidite ...) n'était retrouvé chez ce malade dont le liquide céphalo rachidien clair, montrait une réaction lymphocytaire (280 éléments/mm3), et une légère augmentation de l'albumine à 0,50 g/l.

Cependant le malade rapporta la survenue chez un de ses enfants âgé de 18 mois d'une parotidite, un mois et demi ou deux mois auparavant (probablement insuffisamment explo-

rée elle avait été rattachée à une éruption dentaire).

Le titrage des anticorps ourliens inhibant l'hémagglutination montra une élévation du 1/40e au 1/640e entre deux sérums, précoce et tardif, et permit de poser le diagnostic de méningite ourlienne.

Diagnostic de formes inapparentes -

L'enfant C... Nathalie, 4 ans, admis dans le service du Professeur MOLLARET avec la notion de contage familial de rougeole présentait un simple catarrhe oculo-nasal isolé, sans éruption, ni signe de Koplick, ni aucun autre signe clinique. Trois jours plus tard, son frère hospitalisé quelques jours auparavant avec le diagnostic de rougeole présentait les symptômes classiques d'oreillons. Les séro-diagnostics de la rougeole et de la rubéole, en inhibition de l'hémagglutination pratiquées chez la petite fille donnaient les titres respectifs suivants : $< 1/5e$ et $< 1/8e$ pour les deux sérums précoce et tardif. Par contre le séro-diagnostic ourlien en séro neutralisation montrait une ascension du 1/2 au 1/16e et un titre de 1/160e en IHA pour le sérum tardif, ce qui permettait de poser le diagnostic d'infection ourlienne inapparente.

Oreillons et grossesse -

Le rôle des oreillons comme cause d'avortements et de malformations congénitales a été envisagé par plusieurs auteurs ; cependant, les observations d'oreillons au cours des premiers mois de la grossesse sont rares. En 1959

HESSELTINE et MYERSON en trouvaient 130 cas dans la littérature médicale : 25 étaient associés à des malformations congénitales, 10 à des avortements ou à des accouchements d'enfants mort-nés. Sur les 25 cas de malformation, une dizaine seulement pouvaient être rattachés avec quelque vraisemblance à une maladie ourlienne survenue avant le 4e mois de gestation ; ces complications sont les types les plus variés (encéphalopathie, rétinopathie, opacité cornéenne bilatérale, imperforation anale, spina bifida, hypospadias, cardiopathie congénitale, atrésie intestinale) sans qu'aucune association caractéristique n'ait toutefois pu être déterminée.

Les risques d'embryopathie, pas plus que ceux d'avortement ne peuvent donc être appréciés avec les données actuelles, le nombre de cas étudiés étant insuffisant pour que l'on puisse lui accorder une réelle valeur statistique.

Un problème intéressant fut soulevé en 1963 à la suite de la publication par NOREN d'une observation de fibroélastose endocardique chez un enfant présentant un test positif d'hypersensibilité cutanée au virus ourlien. Cette association fut retrouvée plusieurs fois (dans certains cas les mères avaient été en contact avec des sujets atteints d'oreillons et même dans un cas la mère avait présenté une infection ourlienne). L'hypothèse d'une corrélation entre la F.E.E. et les formes congénitales d'oreillons avec passage transplacentaire du virus ourlien avait alors été émise.

Cependant des études ultérieures comme celle de GERSONY ont montré que cette positivité du test cutané ne s'accompagnait pas d'une mon-

tée des anticorps ourliens (FC, IHA ou SN) et que le virus n'avait en aucun cas pu être isolé.

Il semble donc actuellement que l'on ne puisse pas retenir de relation entre F.E.E. et oreillons, cependant cela démontre l'intérêt de la poursuite des études sérologiques dans les cas d'oreillons survenant durant la gestation.

Chez une femme enceinte de 7 mois hospitalisée pour oreillons dans le service du Professeur BASTIN, la réaction d'inhibition de l'hémagglutination pratiquée au 2e jour et au 12e jour de la maladie donnait les titres respectifs suivants : 1/10e et 1/40e.

A la naissance, trois mois plus tard, l'examen clinique de l'enfant né à terme était absolument normal. Les anticorps ourliens furent alors retrouvés chez la mère et chez l'enfant au taux de 1/160e. Les anticorps présents chez l'enfant pouvaient être d'origine maternelle transmis passivement in utéro ou pouvaient avoir été élaborés activement par l'enfant lui-même, contaminé lui aussi par le virus ourlien.

Un nouveau dosage comparatif, trois mois plus tard donnait les titres de 1/80e pour la mère et de 1/20e pour l'enfant ; cependant l'absence de sérum prélevé les mois suivants chez l'enfant ne permettait pas de conclure formellement au simple passage d'anticorps maternels dans la circulation foetale.

III - Dépistage de l'immunité et appréciation de l'efficacité d'un vaccin

Maladie bénigne de l'enfance en général, les oreillons peuvent cependant, nous l'avons vu, entraîner des complications graves, parfois mortelles : méningites, méningo-encéphalites, pancréatites et orchites qui accompagnent dans 25 p.cent des cas les parotidites survenant après la puberté et qui peuvent entraîner une stérilité secondaire. Une immunisation artificielle serait donc d'une grande utilité à condition d'être inoffensive, efficace et durable afin qu'elle n'ait pas pour conséquence de retarder la maladie à un âge où les complications sont plus fréquentes et plus graves.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination est alors d'une grande utilité pour dépister les sujets réceptifs qui pourraient profiter de la vaccination et pour contrôler ses résultats.

Dès 1946, ENDERS et STOKES préparèrent des vaccins tués par le formol à partir de parotides de singes infectés, puis HENLE et d'autres auteurs à partir de 1951 utilisèrent les liquides d'oeufs embryonnés inactivés par l'éther, les ultra-violets ou le formol.

Cependant, ROTH a montré que même en injectant des doses très fortes (10 ml) de ces vaccins formolés, le pourcentage de séro conversion restait très faible (17 p.cent) et que l'apparition plus fréquente d'une hypersensibilité cutanée ne semblait pas spécifique mais plutôt due aux protéines de l'oeuf.

Malgré la répétition des injections à la dose de 1 ml les résultats restaient décevants.

En 1961 SMORODINTSEV met au point un vaccin atténué par passages sur oeufs embryonnés ; injecté par voie intradermique ou sous cutanée il confère une immunité dans 90 p.cent des cas et son efficacité est prouvée pour des périodes de plus de 5 ans.

En 1963, BUYNAK et HILLEMAN expérimentent un vaccin atténué à la suite de 17 passages sur oeufs embryonnés et sur culture de cellules d'embryon de poulet ; il s'agit de la souche Jeryl Lynn B provenant d'une malade qui présentait une parotidite ourlienne isolée. Il s'administre en une seule injection sous cutanée, à la dose de 1 ml ou de 0,5 ml.

Avant l'inoculation chez tous les individus dépourvus d'antécédent ourlien un dosage des anticorps neutralisants est pratiqué afin de vérifier leur réceptivité ; ceci élimine presque la moitié des sujets dont un grand nombre avait dû présenter des infections inapparentes.

Chez tous les sujets vaccinés, 28 jours après l'injection, des anticorps neutralisants ou inhibant l'hémagglutination sont retrouvés avec des titres moyens respectifs de 1/11 et 1/12.

L'injection de cette même souche mais après 12 passages seulement permet également l'apparition d'une bonne immunité, mais provoque parfois de légères parotidites, de plus le virus peut alors être retrouvé dans la cavité buccale des individus vaccinés.

Par contre, la vaccination avec une souche ayant subi plus de 17 passages perd son efficacité.

Dans des études ultérieures, pratiquées sur de grandes populations, les mêmes auteurs ont confirmé la parfaite inocuité de la souche vaccinale Jeryl Lynn B (absence de parotidite, de toute réaction clinique même fébrile) et son efficacité (apparition d'anticorps protecteurs dans 97 p.cent des cas). L'immunité active ainsi conférée est solide et permet de résister à un contage massif. Aucune élimination de virus vaccinal n'a été retrouvée et l'immunisation ne s'étend pas aux sujets réceptifs en contact avec les vaccinés.

La séro conversion peut être vérifiée par dosage des anticorps inhibant l'hémagglutination ou séroneutralisants ; cependant les titres trouvés après vaccination sont plus bas que ceux qui traduisent une infection naturelle. Les titres moyens retrouvés dans cette étude sont les suivants :

Après infection naturelle, 1/60e en séroneutralisation et 1/9e en inhibition de l'hémagglutination.

Après vaccination
respectivement 1/9e et 1/5e.

Aussi les auteurs conseillent-ils l'utilisation de la réaction d'IHA, simple et rapide à réaliser en grande série et dans les cas où le titre est inférieur ou égal au 1/5e, un dosage de contrôle par séroneutralisation. Cependant les titres qu'ils rapportent en IHA, dans les cas d'infections naturelles semblent très inférieurs à ceux que nous avons obtenus au laboratoire.

Ces études récentes ne permettent pas encore de connaître le devenir de l'immunité acquise au delà du 20e mois suivant la vaccination, mais les analogies étroites avec le

vaccin atténué de Enders contre la rougeole laissent espérer une longue efficacité.

D'autre part on peut noter qu'aucune apparition d'anticorps ourliens n'a été observée chez des sujets ayant reçu des vaccins tués préparés avec le virus respiratoire syncitial ou les virus parainfluenzae 1,2,3 malgré les relations antigéniques qui ont été décrites entre ces derniers et le virus ourlien.

-:-

CONCLUSIONS

-:-

De cette étude sur l'hémagglutinine ourlienne et sur les différentes possibilités de diagnostic sérologique des infections ourliennes, nous pouvons donc conclure à la supériorité de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination sur la réaction de fixation du complément et sur le dosage des anticorps ourliens par séroneutralisation.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination est facile à réaliser à partir d'une hémagglutinine qui peut être produite en grande quantité selon la technique classique que nous indiquons sur des cultures cellulaires sensibles, couramment utilisées dans un laboratoire de virologie. Cette hémagglutinine conserve longtemps ses propriétés à la température du réfrigérateur ou du congélateur et pourrait donc être mise à la disposition de laboratoires intéressés (à notre connaissance aucune hémagglutinine ourlienne n'est actuellement commercialisée).

Nous avons montré que l'hémagglutinine ourlienne est active sur les globules rouges de Singe rhésus ; ces globules ont l'avantage d'être déjà utilisés dans d'autres réactions d'inhibition de l'hémagglutination pour titrer les anticorps formés au cours d'infections par le virus de la rougeole et la plupart des adénovirus.

La réaction elle-même est simple et rapide à réaliser selon une technique qui est de plus en plus utilisée.

Elle est sensible et spécifique et les résultats obtenus sont facilement interprétables en cas d'ascension du titre des anticorps au cours de la maladie ; cependant il est parfois indispensable notamment en cas d'enquête épidémiologique de traiter les sérums pour retirer les inhibiteurs non spécifiques.

Si son intérêt est limité à la confirmation du diagnostic clinique devant un cas de parotidite en période d'épidémie ourlienne par exemple, il est évidemment plus grand lorsque le diagnostic clinique est incertain : cas sporadiques, parotidites unilatérales, formes frustes ou inapparentes, infections associées, atteinte de glandes salivaires autres que les parotides.

Le séro-diagnostic devient même indispensable pour affirmer l'étiologie ourlienne de certaines localisations primitives : pancréatite, méningite lymphocytaire et méningo-encéphalites, orchites. C'est alors que la réaction d'inhibition de l'hémagglutination facilement réalisable en série dans un laboratoire hospitalier prend toute sa valeur.

Le titrage des anticorps ourliens par inhibition de l'hémagglutination, comme tout diagnostic virologique indirect, doit obligatoirement, rappelons-le, être effectué sur une paire de sérums, l'un étant prélevé le plus précocement possible au cours de la maladie, dès l'apparition des premiers signes cliniques, l'autre étant prélevé 8 à 10 jours plus tard, afin de démontrer une éventuelle ascension du taux des anticorps ourliens.

Les anticorps ourliens inhibant l'hémagglutination persistent longtemps dans le sérum des sujets infectés par le virus et des études systématiques de populations permettent de mieux connaître l'épidémiologie de cette infection, d'autre part des études pratiquées chez des femmes enceintes atteintes d'oreillons pourront préciser des conséquences éventuelles de formes congénitales et l'existence d'un éventuel rôle tératogène.

Enfin, cette réaction d'inhibition de l'hémagglutination prend toute son importance dans le contrôle de l'efficacité des différents vaccins (inactivés ou atténués) qui ont déjà été expérimentés ; elle permet de dépister la plupart des individus réceptifs, de vérifier la séroconversion qui suit la vaccination et témoigne de son caractère efficace et durable.

-:-

Vu :
Le Président :
Signé : D. CHRISTOL

Vu :
Le Doyen :
Signé : G. BROUET

Vu et Permis d'Imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :
Signé : Jean ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

-:-

BRANDT C.
Inclusion body formation with Newcastle disease and mumps virus in cultures of chick embryo cells.
Virology, 1958, 5, 177-191.

BUCKLAND F.E. et TYRRELL D.A.J.
A comparative study of virus haemagglutinins. The stability of haemagglutinins and red cell receptors to certain physical and chemical treatments.
J. gen. Microbiol., 1963, 32, 241-253.

BUYNAK E., HILLEMAN M. et coll.
Live attenuated mumps virus vaccine.
I. Vaccine development.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 123; p. 768-775.

II. Early clinical studies.
Pediatrics, 1967, 39, 3, p. 363-371.

III. Clinical and serological aspects in a field evaluation.
New England J. of Med., 1967, 276, p.245-251.

IV. Protective efficacy as measured in a field évolution.
New England J. of Med., 1967, 276, p.252-258.

BUYNAK E.B., WHITMAN J.E., ROEHM R.R., MORTON D.H., LAMPSON G.P. et HILLEMAN M.R.
Comparison of Neutralization and hemagglutination-inhibition techniques for measuring mumps antibody.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 1967, 125, 1068-1071.

BUYNAK E., HILLEMAN M. et coll.
Jeryl Lynn strain live attenuated mumps virus vaccine.
J. Amer. Med. Assoc., 1968, 203, p.9-18.

CANTELL K. et PENTTINEN K.
Role of inhibitors in hemagglutination behaviour of mumps virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104, p. 488-490.

CANTELL K.
Mumps virus.
Adv. virus res., 1961, 8, p. 123-124.

CELERS J.
Oreillons.
Encyclopédie médico-chirurgicale, vol.IX.

CHU L.W., MORGAN H.R.
Studies on the hemolysis of red cells by mumps virus.
J. exp. Med., 1950, 91, p. 393-402.

DAGUET G.L.
La réaction de fixation du complément en virologie.
Rev. franç. Et. clin. Biol., 1961, VI, 940-952.

DE MEIO J.L. et WALKER D.L.
Demonstration of antigenic relationship between mumps virus and hemagglutinating virus of Japan.
J. Immunol., 1957, 78, p. 465-471.

ECKERT H.L., PORTNOY B., SALVATORE M.A., KRELL M.

The hemagglutination inhibition and complement fixation tests in the serodiagnosis of mumps central nervous system disea se.
Am. J. Clin. Path., 1967, 47, nº 4, 481-483.

ENNIS F.A., JACKSON D.
Isolation of virus during the incubation period of mumps infection.
J. of Pediatrics, St Louis, 72, 4, 536-537.

EVANS A.S.
Newcastle disease neutralizing antibody in human sera and its relationship to mumps virus.
Am. J. Hyg., 1954, 60, p. 204-213.

FELDMAN H.
Heparin MnCl2 removal of non spécific serum inhibitor for measles virus hemagglutinin.
J. Immunol., 1968, 100, nº 6.

FERGUSON et TOMKIUS
Chromosome studies during long term cultivation of epithelioid cercopithecus and cynomolgus monkey kidney cell lines
J. National Cancer Institute, 1964, 33, nº 4, p. 619-630.

FRIEDMANN R., HOLTZ A., BARON S., SILBERGELD S. et BUCKLER C.
Studies on rapid immunization with mumps vaccine.
Amer . J. Hygiene, 1963, 78, 3, p. 269-274.

GAIKO (N.V.).
Material for a study of immunity against mumps by the neutralization reaction in tissue cultures.
J. Hyg. Epid. Mic. Immun., 1965, 9, p.500-510.

GEME J., NOREN G., ADAMS P.
Proposed embryopathic relation between mumps virus and primary endocardial fibroelastosis.
New England J. Med., 1966, 275, p. 339-347.

GERSONY W., KATZ S., NADAS A.
Endocardial fibroelastosis and the mumps virus.
Pediatrics, 1966, 37, 3, p. 430-434.

GOLD H., BOXERBAUM B.
Mumps arthritis.
Am. J. Dis. Child, 1968, 116, p. 547-548.

GRESSER I. et ENDERS J.
Cytopathogenicity of mumps virus in cultures of chick embryo on human amnion cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, 107, p. 804-807.

HABEL K.
Cultivation of mumps virus in the developping chick embryo and its application to studies of immunity to mumps in man
Pub. Health Rep., 1945, 60, p. 201-202.

HENLE W., et ENDERS J.F.
Mumps virus.
Viral and Rickettsial infections of man, 4e édition.

HENLE G., DEINHARDT F. et GIRARDI A.
Cytolytic effects of mumps virus in tissue cultures of epithelial cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 87, p. 386-393;

HENLE G., DEINHARDT F.
Propagation and primary isolation of mumps virus in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, p. 556-560.

HILLEMAN M., BUYNAK E., WEIBEL R. et STOKES J.
Live attenuated mumps virus vaccine.
New England J. Med., 1968, 278, p. 227-232.

HOPPS, BERNHEIM, NISALAK et coll.
Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the african green monkey.
J. Immun., 1963, 91, p. 416-424.

HORNE R.W., WATERSON A.P., WILDY P. et FARNHAM A.E.
The structure and composition of myxoviruses.
Virology, 1960, 11, p. 79-98.

JOHN J. et FULGINITI V.
Increase in hemagglutinin titer on treatment with tween 80 and ether.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 121, 109-111.

JOHNSON C.D. et GOODPASTURE E.W.
An investigation of the etiology of mumps
J. Exp. Med. 1934, 59, p. 1-20.

KILHAM L.
Isolation of mumps virus from the blood of a patient.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 69, pp.99-100.

LAVERGNE, SCHAACK, DUPUIS, GEORGE et OLIVE.
Etude de la technique d'immunofluorescence du virus ourlien en culture de cellules thyroïdiennes humaines.
Annales Institut Pasteur, 110, p. 290-297.

LENNETTE E.H., JENSEN F.W., GUENTHER R.W. et MAGOFFIN R.L.
Serologic responses to para-influenza viruses in patients with mumps virus infection.
J. Lab. clin. med. Saint-Louis, 1963, 61, 5; p. 780-788.

LEVENS J.H. et ENDERS J.
The Hemagglutinative properties of amniotic fluid from embryonated eggs infected with mumps virus.
Science, 1945, 162, p. 117-120.

LUZYANINA T.Y., SMORODINTSEV A.
Neutralization of mumps virus in chick embryo cell cultures.
(Acta virol., 1965, 9, 160-164.

MEYER M., STIFLER W., MEHSEN Joseph J.
Evaluation of mumps vaccine given after exposure to mumps, with special reference to the exposed adult.
Pediatrics 1966, 37, n° 2, p. 304-315.

MANN J., ROSSEN R., LEHRICH J. and KASEL J.
The effect of kaolin on immunoglobulins : an improved technique to remove the non specific serum inhibitor of reovirus hemagglutination.
Journal of Immunology, 1967, 98, 6, p. 1136-1142.

MEYER M.
An epidemiologic study of mumps ; its spread in schools and families.
Am. J. Hyg., 1962, 75, n°2, p.259-281.

MONTEIRO G., LILLICRAP C.
Case of mumps nephritis.
Brit. Med. J., 1967, 4, p. 721-722.

PEROL Y., DELRIEU F., LAUFER J.
Pseudophlegmon parotidien d'origine ourlienne.
Revue de stomatologie, 1969, 70.

PLOTKIN S., BECHTEL D. and SEDWICK D.
A simple method for removal of rubella hemagglutination inhibitors from serum adaptable to finger-tip blood.
Amer. J. Immunology, 1968, 88, 3, p.301-304.

REED D., BROWN G., MERRICK R. et coll.
A mumps epidemic on St George Island, Alaska.
J. Am. Med. Ass., 1967, 199, p.967-971.

ROBBINS F.C., KILHAM L., LEVENS J.H., ENDERS J.F.
An evolution of the test for antihemagglutinin in the diagnosis of infections by the mumps virus.
J. immunology, 1949, 61, p. 235-242.

ROBERTS W, FOX S.
Mumps of the heart.
Circulation, Sept. 1965, 32

ROTH A.
Immunization with live attenuated mumps virus vaccine in Honolulu.
Amer. J. Dis. Child, 115, p. 459.

SCHMIDT, LENNETTE et coll.
The sensibility of grivet monkey cell line BSC 1 for propagation and isolation of certain human viruses.
Am. J. Public. Health, 1964, 54, nº 9, p. 1522-1530.

SCHWARTZ G., YOUNG D., NOONE E.
Meningoencephalo-myelitis with epidemic parotidis.
Arc. Neurology, 1964, 11, p. 453-462.

SHONE J., ARMAS S., MANNING J., KEITH J.
The mumps antigen skin test in endocardiae fibroelastosis.
Pediatrics, 1966, 37, 3, p. 423-429.

SOHIER R.
Diagnostic des maladies à virus (1 vol. Flammarion, édit.)

THOMAS F.B., PERKINS R.L., SASLAW S.
Paralytic mumps infection in two sisters.
Arc. Int. Med., 1968, 121, p. 45-49.

UTZ J.
Clinical and laboratory studies of mumps.
PSEBM, 1958, 99, pp. 259-261.

UTZ J.P. et SZWED G.F.
Comparison of methods for détection of viruria.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1962, 110, p. 841-844.

UTZ J., HOUK V. et ALLING D.
Clinical and laboratory studies of mumps Viruria and abnormal renal function.
New Engl. J. Med., 1964, 270, p. 1283-1286.

SUGG W., FINGER J., LEVINE R. et PAGANO J.
Field evaluation of live mumps virus vaccine.
Pediatrics, 1968, 72, 4, p. 461-466.

VOSBURGH J., DIEHL A. and coll.
Relationship of mumps virus to Endocardial fibroelastosis.
Amer. J. Dis. Child, 1965, 109, p. 69-74.

WITTE C.L. et SCHANZE B.
Pancreatites due to mumps.
J. Amer. Med. Ass., 1968, 203, p. 1067-1069.

WITTE J., KARCHMER A.
Surveillance of mumps in the United States as background for use of vaccine.
Public health reports, 1968, 82, n° 2, p. 95-100.

ZECHOVSKY N.
Sérologie de la rubéole par inhibition de l'hémagglutination.
Thèse, 1968, Paris.

-:-